

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 39 12 046 A 1

⑯ Int. Cl. 5:

C 09 B 62/002

C 09 B 23/01

C 09 B 23/14

C 09 B 69/10

G 01 N 33/58

C 12 P 21/04

C 07 H 21/04

C 07 K 15/00

C 12 Q 1/04

A 61 K 47/00

C 12 N 15/00

// C09B 62/78,62/04,

62/36,62/28,62/62,

C07H 3/06

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯
02.09.88 US 240756

⑯ Anmelder:
Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, Pa., US

⑯ Vertreter:
Kraus, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Weisert, A.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Spies, J., Dipl.-Phys.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑯ Erfinder:
Waggoner, Alan S., Pittsburgh, Pa., US

⑯ Verfahren zum Markieren einer Komponente einer wässrigen Flüssigkeit

Beschrieben wird ein Verfahren zum Markieren einer Komponente einer wässrigen Flüssigkeit, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

(a) zu der die genannte Komponente enthaltenden Flüssigkeit einen Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe Cyanin-, Merocyanin- und Styryl-Farbstoffe, der an einen aromatischen Kern angeheftet mindestens eine Sulfonsäure oder Sulfonatgruppe enthält, zusetzt, wobei der genannte Farbstoff mit der genannten Komponente reaktiv ist, und
(b) den Farbstoff mit der genannten Komponente umsetzt, so daß der Farbstoff die genannte Komponente markiert.

DE 39 12 046 A 1

DE 39 12 046 A 1

Beschreibung

Cyanin-Farbstoffe und damit verwandte Polymethin-Farbstoffe mit lichtabsorbierenden Eigenschaften sind bereits in photographischen Filmen verwendet worden. Obgleich solche Farbstoffe lichtabsorbierende Eigenschaften erfordern, benötigen sie keine Lumineszenz-(Fluoreszenz- oder Phosphoreszenz-)Eigenschaften. Cyanin-Farbstoffe mit Lumineszenz-Eigenschaften haben bislang eine nur sehr eingeschränkte Verwertung erfahren. Eine solche Verwendung ist beispielsweise die Markierung der Sulfhydrylgruppe von Proteinen. In einem Bericht, Salama, G., Waggoner, A. S. und Abramson J., wird unter dem Titel "Sulfhydrylreagens-Farbstoffe lösen die rasche Freisetzung von Ca^{2+} aus Sarcoplasmin-Reticulum-Bläschen (SR)" aus Biophysical Journal, 47, 456a (1985), festgestellt, daß Cyanin-Chromophore mit einer Iodacetylgruppe zur Bildung von kovalenten Bindungen mit Sulfhydrylgruppen auf dem Sarcoplasmin-Reticulum-Protein bei einem pH-Wert von 6,7, um die Ca^{2+} -Freisetzung auszulösen, verwendet wurden. In dem Bericht heißt es auch, daß Fluoreszenz-Farbstoffe dazu verwendet wurden, um diese Proteine zu markieren und zu isolieren.

In einem Bericht von Waggoner, A. S., Jenkins, P. L., Carpenter, J. P. und Gupta, R. mit dem Titel "Kinetik von Konformationsveränderungen in einem Bereich des Rhodopsin-Moleküls, von der Retinyliden-Bindungsstelle entfernt" in Biophysical Journal, 33, 292a (1981), stellen die Autoren fest, daß die Sulfhydrylgruppe auf dem F1-Bereich von Vieh-Rhodopsin mit einem Cyanin-Farbstoff mit einer Absorption bei 660 nm kovalent markiert worden ist. Auch gemäß diesem Bericht werden Cyanin-Farbstoffe zum spezifischen Markieren der Sulfhydrylgruppe eines Proteins verwendet. Die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen wird jedoch in diesem Bericht nicht beschrieben.

Ein Artikel mit der Überschrift "Internationaler Workshop über die Anwendung von Fluoreszenz-Photobleichungstechniken auf Probleme der Zellbiologie" von Jacobson K., Elson E., Koppel D., Webb W. in Fed. Proc. 42: 72-79 (1983), berichtet über eine Artikel, der von A. Waggoner eingereicht wurde. Dieser bezieht sich auf Fluoreszenz-Sonden vom Cyanintyp, die an Proteine konjugiert werden können und die im tieferen Rotbereich des Spektrums angeregt werden können.

In den obengenannten drei Berichten werden als einzige Cyanin-Sonden nur solche erwähnt, die sich kovalent spezifisch an die Sulfhydrylgruppe eines Proteins anheften. Die einzige speziell genannte Cyaninverbindung ist eine solche, die eine Iodacetylgruppe aufweist, welche Gruppe bewirkt, daß der Cyanin-Farbstoff gegenüber der Sulfhydrylgruppe kovalent reaktiv wird. In keinem der oben angegebenen Berichte wird die kovalente Reaktion eines Cyanin-Farbstoffs mit irgendeinem anderen Material als einem Protein oder mit irgendeiner anderen Gruppe auf einem Protein an einer Sulfhydrylgruppe beschrieben.

Viele Nicht-Proteinmaterialien haben jedoch keine Sulfhydrylgruppen, und viele Proteine weisen keine genügende Anzahl von Sulfhydrylgruppen auf, um diese Gruppen für die Zwecke der Fluoreszenz-Sondierung geeignet zu machen. Dazu kommt noch, daß Sulfhydrylgruppen (-SHSH-) leicht zu Disulfiden (-S-S-) in Gegenwart von Luft oxidiert werden und daher für die kovalente Anheftung an eine Fluoreszenz-Sonde nicht mehr verfügbar werden.

Erfindungsgemäß wurden nun Cyanin- und damit verwandte Polymethin-Farbstoffe entwickelt, die Substituentengruppen besitzen, die unter geeigneten Reaktionsbedingungen nicht nur mit Sulfhydrylgruppen, sondern auch mit Amin-(-NH₂-) und Hydroxy(-OH-)Gruppen oder anderen Gruppen, wie Aldehyd(-CHO-)Gruppen, auf Proteinen und anderen Materialien kovalent reaktiv sind, um eine Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Erfassung dieser Materialien zu ermöglichen. Durch die Erfindung werden erhebliche Vorteile gegenüber der Verwendung der Iodacetyl-Cyanin-Farbstoffe nach dem Stand der Technik und ihrer spezifischen Reaktivität mit Sulfhydrylgruppen realisiert. Amin- und Hydroxygruppen herrschen in Proteinen und anderen Materialien stärker vor als Sulfhydrylgruppen, und sie sind stabiler. Wenn daher Fluoreszenz-Cyanin-Farbstoffe zur Erfassung des Vorhandenseins von bestimmten Proteinen verwendet werden, wird ein stärkeres Fluoreszenz- oder Phosphoreszenz-Lichtintensitätssignal abgegeben, weil eine größere Anzahl von Farbstoffmolekülen an das zu sondierende Protein angeheftet werden kann. Weiterhin werden Amin- und Hydroxygruppen leichter an Komponenten, die markiert werden sollen, wie Polymerteilchen, die von Natur aus weder Sulfhydryl-, Amin- oder Hydroxygruppen enthalten, angeheftet.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, bei dem Lumineszenz-Cyanin-Farbstoffe, die eine Gruppe enthalten, die mit Amingruppen oder Hydroxygruppen oder anderen reaktionsfähigen Gruppen kovalent sind, dazu verwendet werden, um Proteine oder andere Materialien mit einer Amin- oder Hydroxygruppe oder einer anderen Gruppe, die dazu imstande ist, sich mit dem Farbstoff in einem Gemisch umzusetzen, verwendet, so daß das Vorhandensein und das Ausmaß des markierten Proteins oder des anderen Materials erfaßt werden kann, nachdem die markierten Komponenten durch chromatographische Methoden abgetrennt worden sind. Nach den oben angegebenen Druckschriften wurde offenbar die Sulfhydrylgruppe speziell deswegen für die kovalente Reaktion ausgewählt, weil sich auf einem Proteinmolekül so wenige dieser Gruppen befinden und weil in manchen Fällen die Sulfhydrylgruppe in der Funktion des Proteins eine signifikante Rolle spielt. Die Autoren konnten daher annehmen, daß der spezielle Ort einer Sulfhydrylgruppe auf einer Proteinstruktur festgestellt werden kann. Gemäß diesen Druckschriften wurde der für die Sulfhydrylgruppe spezifische Farbstoff auch als Sonde verwendet, um Strukturveränderungen in einem speziellen Protein zu erfassen oder zu erzeugen. Um eine Veränderung der Lichtabsorption durch den Farbstoff oder das durch die Farbstoffbindung freigesetzte Calciumion zu interpretieren, war es erforderlich, zu wissen, wo die Sonde gebunden ist.

Da auf den meisten Proteinmolekülen so wenige Sulfhydrylgruppen sind, können diese Gruppen nicht genügend zahlreich sein, um eine angemessene Gesamtluumineszenz für Erfassungsuntersuchungen zu ergeben. Demgegenüber sind Amin- und Hydroxygruppen signifikant zahlreicher, und sie sind auf einem Proteinmolekül weit dispergiert, wodurch es ermöglicht wird, daß eine Fluoreszenz-Sonde an vielfache Stellen auf dem Molekül angefügt wird, wodurch eine Interpretation der Lichtabsorptions- und Fluoreszenzveränderungen durch Er-

leichterung der Erfassung des Proteins ausgeschlossen wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Markierung mit Lumineszenz-Polymethin-Cyanin- und verwandten Polymethin-Farbstoffen, wie Merocyanin- und Styryl-Farbstoffen, von Proteinen und anderen Materialien mit Einschluß von Nucleinsäuren, DNA, Arzneimitteln, Toxinen, Blutzellen, mikrobiellen Materialien, Teilchen, Kunststoff- oder Glasoberflächen, Polymermembranen etc. an einer Amin- oder Hydroxystelle auf den genannten Materialien. Die Farbstoffe sind vorteilhafterweise in einem wässrigen oder einem anderen Medium, in dem das markierte Material enthalten ist, löslich. Die vorliegende Erfindung betrifft ein zweistufiges Markierungsverfahren zusätzlich zu einem einstufigen Markierungsverfahren. Bei dem zweistufigen Markierungsverfahren kann eine primäre Komponente, wie ein Antikörper, an Stellen darauf mit Einschluß von Amin-, Hydroxy-, Aldehyd- oder Sulfhydrylstellen, markiert werden, und die markierte Komponente wird als Sonde für die sekundäre Komponente, wie ein Antigen, für das der Antikörper spezifisch ist, verwendet.

Gemäß dem oben diskutierten Stand der Technik wurde die Spezifität der Stelle der Anheftung durch eine Cyanin-Sonde dadurch erhalten, daß eine Sonde verwendet wurde, die gegenüber einer Sulfhydrylgruppe kovalent reaktiv ist. Gemäß dem erfindungsgemäßen zweistufigen Verfahren können Cyanin- und damit verwandte Sonden in einer ersten Stufe mit Amin-, Aldehyd-, Sulfhydryl-, Hydroxy- oder anderen Gruppen auf einer ersten Komponente, wie einem Antikörper, umgesetzt werden, worauf der Antikörper die gewünschte Spezifität in einer zweiten Komponente, wie einem Antigen, in einer zweiten oder Anfärbungsstufe erhalten kann, wobei die Spezifität durch die Antigenstelle der Anheftung an den Antikörper bestimmt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Lumineszenz-Polymethin-Cyanin-Verbindungen und damit verwandte Verbindungen, die Gruppen enthalten, die sie in die Lage versetzen, kovalent an Amin-, Hydroxy-, Aldehyd- oder Sulfhydrylgruppen auf einem Targetmolekül angeheftet zu werden. Die Erfindung richtet sich weiterhin auf monoklonale Antikörper und andere Komponenten, die mit diesen Lumineszenz-Cyanin-Verbindungen markiert sind und die dazu imstande sind, Sonden für Antigene zu sein. Wenn das Target eine Zelltype ist, dann kann die vorliegende Erfindung dazu verwendet werden, die Menge der markierten Antikörper zu messen, die an die genannte Zelltype angeheftet ist. Die Messung kann in der Weise erfolgen, daß man die relative Helligkeit oder Abschwächung der Lumineszenz der Zellen erfaßt.

Die vorliegende Erfindung kann dazu verwendet werden, die Konzentration eines bestimmten Proteins oder einer anderen Komponente in einem System zu bestimmen. Wenn die Anzahl der reaktiven Gruppen auf einem Protein, das mit einer Sonde umgesetzt werden kann, bekannt ist, dann ist die Fluoreszenz pro Molekül bekannt, und die Konzentration dieser Moleküle in dem System kann anhand der Gesamt-Lumineszenzintensität des Systems ermittelt werden.

Das Verfahren kann dazu angewendet werden, um eine Vielzahl von Proteinen oder anderen Materialien in einem System quantitativ zu bestimmen, indem man alle eines Gemisches von Proteinen in dem System markiert und sodann die markierten Proteine durch irgendwelche Maßnahmen, wie chromatographische Maßnahmen, abtrennt. Die Menge der abgetrennten Proteine, die lumineszieren, kann bestimmt werden. In chromatographischen Erfassungssystemen kann der Ort des Farbstoffs auf dem markierten Material ermittelt werden.

Die Erfindung kann auch dazu verwendet werden, um die Anzahl von verschiedenen Zellen, die mit einem Antikörper etikettiert sind, zu bestimmen. Diese Bestimmung kann in der Weise erfolgen, daß man eine Vielzahl von Typen der Zellen in einem System etikettiert und sodann die etikettierten Zellen außerhalb des Systems abtrennt. Auch können die etikettierten Zellen von nichtetikettierten Zellen außerhalb des Systems abgetrennt werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt ein Multiparameter-Verfahren, bei dem eine Vielzahl von Lumineszenz-Cyanin- oder verwandten Farbstoffen verwendet wird, die jeweils an eine Vielzahl von verschiedenen primären Komponenten, wie Antikörpern, angeheftet sind, wobei jeder Farbstoff für eine unterschiedliche sekundäre Komponente, wie ein Antigen, spezifisch ist, um jeden einer Vielzahl der genannten Antigene in einem Gemisch von Antigenen zu identifizieren. Gemäß dieser Ausführungsform wird jeder der genannten Antikörper gesondert mit einem Farbstoff mit verschiedener Lichtabsorption und verschiedenen Lumineszenzwellenlängen-Eigenschaften als der Farbstoff, der zur Markierung der anderen Sonden verwendet wird, markiert. Sodann werden alle markierten Antikörper zu einem zu analysierenden biologischen Präparat gegeben, das sekundäre Komponenten, wie Antigene, enthält, welche jeweils durch bestimmte markierte Antikörper angefärbt werden können. Irgendwelche nichtumgesetzten Farbstoffmaterialien können aus dem Präparat beispielsweise durch Auswaschen entfernt werden, wenn sie die Analyse stören. Das biologische Präparat wird sodann einer Vielzahl von Anregungswellenlängen ausgesetzt, wobei jede verwendete Anregungswellenlänge die Anregungswellenlänge eines bestimmten konjugierten Farbstoffs ist. Ein Lumineszenzmikroskop oder ein anderes Lumineszenz-Erfassungssystem, wie ein Fließ-Cytometer oder ein Fluoreszenz-Spektrophotometer, das Filter oder Monochromator zur Auswahl der Strahlen der Anregungswellenlänge und zur Auswahl der Wellenlängen der Lumineszenz aufweist, wird dazu verwendet, um die Intensität der Strahlen der Emissionswellenlänge, die der Anregungswellenlänge entspricht, zu bestimmen. Die Intensität der Lumineszenz bei Wellenlängen, die der Emissionswellenlänge eines bestimmten konjugierten Farbstoffs entspricht, zeigt die Menge des Antigens an, die an den Antikörper gebunden ist, an den der Farbstoff angefügt ist. In bestimmten Fällen kann eine einzige Wellenlänge der Anregung dazu verwendet werden, um Lumineszenz von zwei oder mehreren Materialien in einem Gemisch zu erregen, wobei jede Fluoreszenz bei einer verschiedenen Wellenlänge und die Menge jeder markierten Art dadurch gemessen werden kann, daß man ihre individuelle Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Fluoreszenzwellenlänge erfaßt. Gewünschtenfalls kann eine Lichtabsorptions-Erfassungsmethode angewendet werden. Das erfindungsgemäße Zweistufen-Verfahren kann auf ein beliebiges System angewendet werden, bei dem ein mit einem Farbstoff konjugiertes primäres Material und dem Farbstoff ge- oder Lichtabsorptions-Erfassungssystem verwendet wird, um das Vorhandensein eines anderen Materials zu erfassen, auf das das Konjugat aus dem primären Material in dem Farbstoff gerichtet ist. So kann beispielsweise

der Farbstoff an ein Fragment von DNA oder RNA konjugiert sein, um ein mit Farbstoff konjugiertes DNA- oder RNA-Fragment zu bilden, das sodann auf einen Hauptstrang von DNA oder RNA gerichtet wird, zu dem das Stück komplementär ist. Das gleiche Testverfahren kann dazu verwendet werden, um das Vorhandensein von irgendeinem komplementären Hauptstrang von DNA zu erfassen.

5 Die erfundungsgemäßen Cyanin- und damit verwandten Farbstoffe sind besonders gut für die Analyse eines Gemisches von Komponenten geeignet, bei dem Farbstoffe einer Vielzahl von Anregungs- und Emissionswellenlängen erforderlich sind, weil spezielle Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe synthetisiert werden können, die einen weiten Bereich von Anregungs- und Emissionswellenlängen haben. Spezielle Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe mit spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen können synthetisiert werden, 10 indem die Anzahl der Methingruppen variiert wird oder indem die Cyanin-Ringstrukturen modifiziert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Farbstoffe mit besonderen Anregungswellenlängen zu synthetisieren, um einer besonderen Anregungs-Lichtquelle, wie einem Laser, zum Beispiel einem HeNe-Laser oder einem Diodenlaser, zu entsprechen.

15 Die Erfindung betrifft die kovalente Reaktion von hochlumineszenten und hochlichtabsorbierenden Cyanin- und damit verwandten Farbstoffmolekülen unter Reaktionsbedingungen mit Amin-, Hydroxy-, Aldehyd-, Sulfhydryl- oder anderen Gruppen auf Proteinen, Peptiden, Kohlenhydraten, Nucleinsäuren, derivatisierten Nucleinsäuren, Lipiden, bestimmten anderen biologischen Molekülen, biologischen Zellen sowie nichtbiologischen Materialien, beispielsweise löslichen Polymeren, Polymerteilchen, Polymeroberflächen, Polymermembranen, Glasoberflächen und anderen Teilchen und Oberflächen. Da die Lumineszenz hochempfindliche optische Techniken umfaßt, kann die Anwesenheit dieser Farbstoff- "Etiketten" erfaßt und selbst dann quantitativ bestimmt werden, wenn das "Etikett" nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Somit können die Farbstoffmarkierungs-Reagentien dazu verwendet werden, die Menge eines Materials, das markiert worden ist, zu messen. Die am besten geeigneten Farbstoffe sind hochlichtabsorbierend ($\epsilon = 70\,000$ bis $250\,000$ l/mol-cm oder höher) und sehr lumineszent, und sie haben Quantenausbeuten von mindestens 5% bis 80% oder mehr. Die qualitativen Eigenschaften betreffen die Farbstoffe selbst und Farbstoffe, die an ein markiertes Material konjugiert sind.

20 Eine wichtige Anwendung für diese Farbmarkierungs-Reagentien ist die Herstellung von lumineszierenden monoklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper sind Proteinmoleküle, die sich sehr eng und sehr spezifisch an bestimmte chemische Stellen oder "Marker" auf Zelloberflächen oder innerhalb von Zellen binden. Diese Antikörper besitzen daher eine enorme Forschungseignung und klinische Eignung zur Identifizierung von bestimmten Zelltypen (zum Beispiel HLA-Klassifizierung, T-Zell-Subsets, Bakterien- und Virenklassifizierung etc.) und erkrankte Zellen. In der Vergangenheit ist die Menge des an eine Zelle gebundenen Antikörpers dadurch quantitativ bestimmt worden, daß man den Antikörper auf verschiedene Weise markiert hat. Das Markieren ist mit einer radioaktiven Markierung (Radioimmuno-Assay), einem Enzym (ELISA-Techniken) oder einem Fluoreszenz-Farbstoff (gewöhnlich Fluorescein, Rhodamin, Texasrot® oder Phycoerythrin) bewerkstelligt worden. Die meisten Hersteller und Anwender von klinischen Antikörper-Reagentien möchten von den mit der Verwendung von radioaktiven Tracern inhärenten Problemen wegkommen, so daß die Lumineszenz als eine der vielversprechendsten Alternativen angesehen wird. Tatsächlich liefern nunmehr viele Firmen mit Fluorescein, Texasrot®, Rhodamin und Phycoerythrin markierte monoklonale Antikörper.

25 In den letzten Jahren ist die optische/elektronische Instrumentierung für die Erfassung von fluoreszierenden Antikörpern auf Zellen komplizierter geworden. So kann beispielsweise die Fließ-Cytometrie dazu verwendet werden, um die Menge von fluoreszierendem Antikörper auf individuellen Zellen mit einer Rate von bis zu 5000 Zellen pro Sekunde zu bestimmen. Auch mikroskopische und Lösungs-Fluoreszenztechniken haben Fortschritte erzielt. Diese Instrumente können eine Fluoreszenz bei vielen Wellenlängen des UV-, sichtbaren und nahen IR-Bereichs des Spektrums erregen. Doch können die meisten der derzeit verfügbaren, verwendbaren Fluoreszenz-Markierungs-Reagentien nur im 400- bis 580-nm-Bereich des Spektrums angeregt werden. Die Ausnahmen sind einige der Pigmente vom Phycobiliprotein-Typ, die aus Meeresorganismen isoliert worden sind und die kovalent an Proteine angeheftet werden können. Diese können bei etwas niedrigeren Wellenlängen angeregt werden. Es gibt daher ein großes Spektralfenster im Bereich von 580 bis ungefähr 900 nm, wo es notwendig ist, daß neue Markierungs-Reagentien zur Markierung von biologischen und nichtbiologischen Materialien verfügbar werden, wobei die Analyse mit der derzeit verfügbaren Instrumentierung durchgeführt werden soll. Neue Reagentien, die in diesem Spektralbereich anregbar sind, würden es ermöglichen, Multifarbstoff-Lumineszenzanalysen von Markern auf Zellen durchzuführen, da Antikörper mit verschiedenen Spezifitäten jeweils mit einem verschiedenen gefärbten Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden könnten. Somit könnte das Vorhandensein von mehreren Markern gleichzeitig für jede analysierte Zelle bestimmt werden.

30 Die Erfindung betrifft auch lumineszierende (fluoreszierende oder phosphoreszierende) Cyanin-, Merocyanin- und Styryl-Farbstoffe selbst, die an biologische und nichtbiologische Materialien kovalent angeknüpft werden können. Merocyanin- und Styryl-Farbstoffe werden für die Zwecke dieser Erfindung als mit Cyanin-Farbstoffen verwandt angesehen. Die neuen Markierungs-Reagentien selbst, jedoch insbesondere dann, wenn sie mit einer markierten Komponente konjugiert sind, können durch Licht von ersten definierten Wellenlängen, zum Beispiel durch Licht in Wellenlängenbereichen des Spektrums von 450 bis 900 nm, angeregt werden. Die Hintergrund-Fluoreszenz von Zellen erfolgt im allgemeinen bei einer niedrigen Wellenlänge. Daher werden sich die Markierungs-Reagentien gegenüber der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheiden. Von besonderem Interesse sind die Derivate, die Licht bei 633 nm absorbieren, da sie durch billige, intensive, stabile und langlebige HeNe-Laserquellen angeregt werden können. Licht von zweiten definierten Wellenlängen, das durch die markierte Komponente fluoresziert oder phosphoresziert wird, kann sodann erfaßt werden. Das fluoreszierte oder phosphoreszierte Licht hat im allgemeinen eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht. In der Erfassungsstufe kann ein Lumineszenz-Mikroskop verwendet werden, das einen Filter zur Absorption von Streulicht der Anregungswellenlänge und zum Durchgang der Wellenlänge hat, die der Lumineszenz entspricht, die der jeweiligen Farbstoff-

markierung entspricht, die mit der Probe verwendet wird. Ein derartiges optisches Mikroskop ist zum Beispiel in der US-PS 46 21 911 beschrieben.

Nicht alle Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe sind lumineszierend. Jedoch schließen die erfundungsgemäßen Farbstoffe solche Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe ein, die lumineszierend sind. Sie sind relativ photostabil, und viele sind in der Reaktionslösung, vorzugsweise einer wässrigen Lösung, löslich. Die konjugierten Farbstoffe selbst, jedoch insbesondere, wenn sie mit einer markierten Komponente konjugiert sind, haben molare Extinktionskoeffizienten (ϵ) von mindestens 50 000 und vorzugsweise mindestens 100 000 Liter pro mol-cm. Der Extinktionskoeffizient ist ein Maß der Fähigkeit der Moleküle, Licht zu absorbieren. Die erfundungsgemäßen konjugierten Farbstoffe haben Quantenausbeuten von mindestens 2% und vorzugsweise mindestens 10%. Dazu absorbieren und emittieren die erfundungsgemäßen konjugierten Farbstoffe Licht im Spektralbereich von 400 bis 900 nm und vorzugsweise im Spektralbereich von 600 bis 900 nm.

Arylsulfonierte Farbstoffe

Es wurde nun gefunden, daß die hierin beschriebenen Arylsulfonat- oder Arylsulfonsäure-Farbstoffe ihrer Natur nach stärker fluoreszierend sind und verbesserte Photostabilitäts- und Wasserlöslichkeitseigenschaften haben als ähnliche Farbstoffe ohne Arylsulfonat- oder Arylsulfonsäuregruppen. Die hierin verwendeten Bezeichnungen Arylsulfonat oder Arylsulfonsäure sollen Arylsulfonsäuregruppen oder Arylsulfonatgruppen bezeichnen, wobei die genannten Gruppen an aromatische Ringstrukturen angefügt sind, mit Einschluß einer einzigen aromatischen Ringstruktur oder einer kondensierten Ringstruktur, beispielsweise einer Naphthalinstruktur. Die einzige aromatische Ringstruktur oder die kondensierte aromatische Ringstruktur kann in Polymethin-, Cyanin-, Merocyanin- oder Styryl-Farbstoffen vorhanden sein.

Viele Farbstoffe mit planaren Molekularstrukturen mit Einschluß von üblichen Cyanin-Farbstoffen neigen dazu, in wässriger Lösung Dimere und Aggregate höherer Ordnung zu bilden, und zwar insbesondere dann, wenn gleichfalls anorganische Salze vorhanden sind, wie es beispielsweise in gepufferten Lösungen und physiologischer Kochsalzlösung der Fall ist. Diese Aggregate haben gewöhnlich Absorptionsbanden, die zu der kurzen Wellenlängenseite der Monomerabsorption verschoben sind, und sie sind im allgemeinen sehr schwach fluoreszierende Arten. Die Tendenz der Cyanin-Farbstoffe, in wässriger Lösung leicht Aggregate zu bilden, ist insbesondere in der Photographie gut bekannt (West, W., und Pearce S., J. Phys. Chem., 69: 2894 (1965); Sturmer, D. M., Spec. Top in Heterocyclic Chemistry, 30 (1974)).

Viele Farbstoffmoleküle und insbesondere Cyanin-Farbstoffmoleküle neigen dazu, in wässriger Lösung Aggregate zu bilden. Es ist gefunden worden, daß die Arylsulfonat-Farbstoffe eine minimale Neigung haben, diese Aggregate zu bilden. Bei Verwendung zur Bildung von fluoreszierenden Markierungs-Reagentien haben die Arylsulfonat-Farbstoffe eine verminderte Neigung, Aggregate zu bilden, wenn sie mit hohen Oberflächendichten an Proteine oder andere Moleküle, wie Antikörper, gebunden werden. Die Tendenz eines bestimmten Farbstoffmoleküls, Aggregate in einer Salzlösung (zum Beispiel 150 mM Natriumchlorid-Lösung) zu bilden, kann als Maß der Neigung des gleichen Farbstoffmoleküls zur Bildung von Aggregaten auf der Oberfläche von Proteinen genommen werden. Für Farbstoffmoleküle wird es daher angestrebt, daß sie eine minimale Neigung haben, in wässrigen Salzlösungen Aggregate zu bilden. Die Werte der Fig. 2 zeigen, daß ein bestimmter arylsulfonierte Farbstoff selbst bei hohen Konzentrationen in wässriger Salzlösung nur eine niedrige Neigung hat, Aggregate zu bilden.

Die Fig. 1 zeigt das Monomer-Absorptionsspektrum und das Dimer-Absorptionsspektrum eines typischen Cyanin-Farbstoffs, gelöst in einem wässrigen Puffer. Der zur Erzeugung dieser Spektren verwendete Farbstoff, N,N'-Disulfonylbutyl-indodicarbocyanin, weist keine Arylsulfonatgruppen auf und bildet selbst bei Konzentrationen im submillimolaren Bereich leicht Dimere. Das Dimer-Spektrum wurde aus den Spektren des Farbstoffs bei verschiedenen Konzentrationen errechnet (vgl. die Methode von West und Pearce, 1965). Bei einer 3-mM-Konzentration in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung waren die Absorptionen der Monomer- und Dimerbanden etwa gleich.

Das Spektrum des verbesserten Sulfoindodicarbocyanins, N,N'-Diethyl-indodicarbocyanin-5,5'-disulfonsäure, ist in Fig. 2 gezeigt. Dieser Farbstoff zeigte bei Konzentrationen bis zu 10 mM kein Anzeichen einer Aggregation in der Kochsalzlösung.

Üblicherweise wird die Wirksamkeit, mit der sich ein bestimmter reaktiver Farbstoff an ein Protein, beispielsweise einen Antikörper, kuppelt, unter definierten Reaktionsbedingungen bestimmt. Der getestete Farbstoff war der Bis-N-hydroxysuccinimidester von N,N'-Di-carboxypentyl-indodicarbocyanin-5,5'-disulfonsäure. Die Fig. 3 zeigt, daß dieser aktive Sulfocyanin-Farbstoff-Ester sich wirksam mit Schaf-Immunoglobulin in einem Carbonat-Puffer bei einem pH-Wert von 9,2 umsetzt, wodurch kovalent markierte Antikörpermoleküle gebildet werden, die ein Molverhältnis von Farbstoff zu Antikörper im Bereich von weniger als 1 bis mehr als 20, je nach den relativen Farbstoff- und Antikörperkonzentrationen, in der Reaktionslösung haben. Die Neigung der linearen kleinsten Quadrate der Werte zeigen, daß unter diesen Bedingungen die Markierungswirksamkeit dieses Farbstoffs etwa 80% ist. Bei ähnlichen Untersuchungen setzte sich Fluorescein-isothiocyanat (FITC) mit einer Wirksamkeit von etwa 20% um.

Die Reaktivität des aktiven Esters des neuen Sulfoindodicarbocyanin-Farbstoffs wurde dadurch untersucht, daß Schaf-Immunoglobulin (IgG) markiert wurde. Das Protein (4 mg/ml) wurde in 0,1 M Carbonat-Puffer (pH = 9,2) aufgelöst. Aliquote Teile des reaktiven Farbstoffs, gelöst in wasserfreiem Dimethylformamid, wurden zu den Proteinproben gegeben, um die ursprünglichen Molverhältnisse Farbstoff : Protein zu ergeben. Nach 30 Minuten wurde das Protein von dem unkonjugierten Farbstoff durch Gel-Permeationschromatographie (Sephadex G-50) abgetrennt. Die resultierenden Molverhältnisse Farbstoff : Protein wurden spektrophotometrisch bestimmt, und sie sind in Fig. 3 dargestellt.

Bei niedrigen Verhältnissen von Farbstoff zu Protein zeigen die Absorptionsspektren der markierten Proteine Banden, die eng den Spektren des freien monomeren Farbstoffs entsprechen. Bei Antikörpermolekülen, die stark markiert worden sind (hohe Verhältnisse Farbstoff : Protein) oder die mit Farbstoffen mit großer Neigung zur Aggregation in wäßrigen Lösungen markiert worden sind, wird oft festgestellt, daß sie neue Absorptionspeaks haben, die bei kürzeren Wellenlängen erscheinen als die Absorptionsbanden des monomeren Farbstoffs in wäßriger Lösung. Die Wellenlänge des neuen Absorptionspeaks fällt häufig in einen Bereich, der für das Dimer-Absorptionsspektrum des Farbstoffs charakteristisch ist (vgl. Fig. 1).

Stärker markierte Antikörper haben höhere Verhältnisse von kurzen zu langen Wellenlängen-Absorptionspeaks. Dieser kürzere Wellenlängen-Absorptionspeak kann in Fig. 4 bei ungefähr 590 nm gesehen werden. Der längere Wellenlängenpeak (bei 645 nm) in Fig. 4 ist auf monomere Farbstoffmoleküle zurückzuführen, die an den Antikörper gebunden sind. Das Markierungs-Reagens, das verwendet wurde, um das Antikörper-Absorptionsspektrum in Fig. 4 herzustellen (der Bis-N-hydroxysuccinimidester von N,N'-Di-sulfobutyl-indodicarbocyanin-5,5'-essigsäure) besitzt keine Arylsulfonatgruppen und bildet leicht in wäßrigen Salzlösungen und auf Antikörpern, mit denen er umgesetzt worden ist, Dimeren. Von entscheidender Bedeutung ist es, daß die Fluoreszenz-Anregungsspektren dieser Antikörper zeigen, daß die Anregung der markierten Antikörper beim kurzen Wellenlängenpeak nicht proportional so viel Fluoreszenz erzeugt wie es bei einer Anregung beim längeren Wellenlängenpeak der Fall ist. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Idee, daß der kürzere Wellenlängen-Absorptionspeak auf die Bildung von nichtfluoreszierenden Dimeren und Aggregaten auf den Antikörpermolekülen zurückzuführen ist.

Es wurde gefunden, daß das zum Erhalt der Werte der Fig. 3 verwendete Markierungs-Reagens, bestehend aus einem Arylsulfonat-Cyanin-Farbstoff, auf den Antikörpermolekülen nicht ohne weiteres aggregiert. Dies ergibt sich aus dem erheblich kleineren Absorptionspeak bei Wellenlängen, bei denen charakteristischerweise Dimeren absorbieren (vgl. Fig. 5). Dies ist deswegen von Wichtigkeit, weil Antikörper und andere Proteine, die mit diesen "nichtaggregierenden" Markierungs-Reagentien markiert worden sind, stärker fluoreszierende markierte Proteine ergeben sollten. Tatsächlich ergeben die Arylsulfocyanine selbst dann glänzend fluoreszierende Antikörper, wenn das mittlere Verhältnis Farbstoff pro Antikörper relativ hoch ist (vgl. Fig. 6).

Schaf-Immunoglobulin (IgG), das mit einem Carboxyindodicarbocyanin-Farbstoff markiert worden ist, ist in Fig. 4 gezeigt. Die Fig. 5 zeigt das Protein, das mit dem neuen Sulfoindodicarbocyanin-Farbstoff konjugiert worden ist. Die Anwesenheit von erhöhtem Dimeren (vgl. Fig. 1) in der erstgenannten Probe ist offensichtlich. Obgleich das Molverhältnis Farbstoff : Protein bei beiden Präparaten ungefähr gleich war, war das in Fig. 5 dargestellte Protein erheblich stärker fluoreszierend als die in Fig. 4 gezeigte Probe.

Um glänzende bzw. hell fluoreszierende Antikörper oder andere Proteine, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert worden sind, zu erhalten, ist es von Wichtigkeit, daß die mittlere Quantenausbeute pro Farbstoffmolekül auf dem Protein so hoch wie möglich ist. Es ist allgemein festgestellt worden, daß, wenn die Oberflächendichte der Farbstoffmoleküle auf dem Protein zunimmt (d. h. wenn das Verhältnis von Farbstoff zu Protein zunimmt), dann die mittlere Quantenausbeute der Farbstoffe vermindert wird. Dieser Effekt ist manchmal dem Auslöschen zugeschrieben worden, das als Ergebnis einer Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkung auf der Oberfläche von starker markierten Proteinen stattfindet. Die Bildung von nichtfluoreszierenden Dimeren auf Proteinoberflächen kann mit Sicherheit zu diesem Auslöschen beitragen. Die Fig. 6 zeigt, daß die mittlere Quantenausbeute eines Arylsulfocyanin-Farbstoffs langsam abnimmt, wenn das Farbstoff/Protein-Verhältnis zunimmt (Kurve mit Diamantensymbolen). Demgegenüber zeigt die Kurve mit den runden Symbolen, daß eine sehr rasche Abnahme der mittleren Quantenausbeute für das Konjugat eines Nicht-Arylsulfocyanin-Farbstoffs (N,N'-Di-sulfobutyl-indodicarbocyanin-5-isothiocyanat) stattfindet, wenn das Farbstoff/Protein-Verhältnis zunimmt. Daher ergibt der in Fig. 6 gezeigte Sulfocyanin-Farbstoff stärker glänzend fluoreszierende Antikörper als der andere Farbstoff, und zwar insbesondere im Markierungsbereich von 1 bis 10 Farbstoffmolekülen pro Antikörpermolekül.

Die mittlere Fluoreszenz-Quantenausbeute der einzelnen Farbstoffmoleküle auf den markierten Proteinen ist ein Maß des von diesen Biomolekülen erhältlichen Fluoreszenzsignals. Werte von Schaf-Immunoglobulin (IgG), das mit dem neuen Sulfoindodicarbocyanin-Farbstoff in phosphatgepufferter Kochsalzlösung markiert worden war, sind in der Kurve mit Diamantensymbolen der Fig. 6 gezeigt. Die Kurve mit runden Symbolen der Fig. 6 zeigt Proteine, die mit einem reaktiven Indodicarbocyaninisothiocyanat-Farbstoff zum Vergleich markiert worden sind. In Fig. 6 stellen die Quantenausbeuten bei einem Verhältnis Farbstoff/Protein von Null die Werte für die Methylamin-Addukte der reaktiven Farbstoffe (freier Farbstoff) im Puffer dar.

55

Hintergrund-Verfahren

Lumineszenz-Sonden sind wertvolle Reagentien für die Analyse und Trennung von Molekülen und Zellen und für die Erfassung und quantitative Bestimmung von anderen Materialien. Eine sehr kleine Anzahl von lumineszierenden Molekülen kann unter optimalen Umständen erfaßt werden. Barak und Webb sehen weniger als 50 Fluoreszenz-Lipid-Analoga im Zusammenhang mit der LDL-Rezeption von Zellen unter Verwendung einer SIT-Kamera, J. Cell. Biol. 90: 595 – 605 (1981). Die Fließ-Cytometrie kann dazu verwendet werden, um weniger als 10 000 Fluoresceinmoleküle zu erfassen, die mit Teilchen oder bestimmten Zellen assoziiert sind (Muirhead, Horan und Poste, Bio/Technology 3: 337 – 356 (1985)). Einige spezielle Beispiele für die Anwendung von Fluoreszenz-Sonden sind (1) die Identifizierung und Trennung von Subpopulationen von Zellen in einem Gemisch von Zellen durch die Techniken der Fluoreszenz-Fließ-Cytometrie, der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung und der Fluoreszenz-Mikroskopie; (2) die Bestimmung der Konzentration einer Substanz, die sich an eine zweite Art bindet (zum Beispiel Antigen-Antikörper-Reaktionen), bei der Technik des Fluoreszenz-Immunoassays; (3) die Lokalisierung von Substanzen in Gelen und anderen unlöslichen Trägern durch die Techniken

der Fluoreszenz-Anfärbung. Diese Techniken werden von Herzenberg et al., "Cellular Immunology", 3. Auflage, Kapitel 22; Blackwell Scientific Publications, 1978 (Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren); und von Goldman, "Fluorescence Antibody Methods", Academic Press, New York, 1968 (Fluoreszenz-Mikroskopie und Fluoreszenz-Anfärbung); und in "Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences", herausgegeben von Taylor et al., Alan Liss Inc, 1986, beschrieben.

Bei der Verwendung von Fluoreszenzmitteln für die obigen Zwecke bestehen hinsichtlich der Wahl des Fluoreszenzmittels viele Beschränkungen. Eine Beschränkung besteht in den Absorptions- und Emissionseigenschaften des Fluoreszenzmittels, da viele Liganden, Rezeptoren und Materialien in der Testprobe, zum Beispiel Blut, Urin, Cerebrospinal-Flüssigkeit, fluoreszieren und die genaue Bestimmung der Fluoreszenz der fluoreszierenden Probe stören. Diese Erscheinung wird als Autofluoreszenz oder Hintergrund-Fluoreszenz bezeichnet. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Fähigkeit des Fluoreszenzmittels, mit Liganden und Rezeptoren und anderen biologischen und nichtbiologischen Materialien zu konjugieren, und der Effekt einer solchen Konjugation auf das Fluoreszenzmittel. In vielen Situationen kann die Konjugierung an ein anderes Molekül zu einer wesentlichen Veränderung der Fluoreszenz-Eigenschaften des Fluoreszenzmittels führen und in manchen Fällen sogar die Quantenleistung des Fluoreszenzmittels wesentlich zerstören oder vermindern. Es ist auch möglich, daß die Konjugierung mit dem Fluoreszenzmittel die Funktion des zu markierenden Moleküls inaktiviert. Eine dritte Erwürdigung liegt in der Quantenleistung des Fluoreszenzmittels, die für eine empfindliche Erfassung hoch sein sollte. Eine vierte Erwürdigung ist die Lichtabsorptionsfähigkeit oder der Extinktionskoeffizient des Fluoreszenzmittels, der so groß wie möglich sein sollte. Von Wichtigkeit ist auch, ob sich die Fluoreszenzmoleküle miteinander umsetzen, wenn sie sich in enger Nähe befinden, was zu einem Selbstauslöschen führen würde. Eine weitere Befürchtung geht dahin, ob eine nichtspezifische Bindung des Fluoreszenzmittels an andere Verbindungen oder Behälterwände entweder selbst oder in Verbindung mit der Verbindung, an die das Fluoreszenzmittel konjugiert wird, erfolgt.

Die Anwendbarkeit und der Wert der oben beschriebenen Methoden sind eng an die Verfügbarkeit von geeigneten fluoreszierenden Verbindungen gekoppelt. Insbesondere besteht ein Bedarf an fluoreszierenden Substanzen, die in dem längeren Wellenlängenbereich des sichtbaren Bereichs (Gelb bis nahe Infrarot) emittieren, da die Anregung dieser Chromophoren weniger Autofluoreszenz und auch vielfache Chromophoren ergibt, die bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren, die gleichzeitig analysiert werden können, wenn die gesamten sichtbaren und die nahen Infrarotbereiche des Spektrums verwendet werden können. Fluorescein, eine weit verwendete fluoreszierende Verbindung, ist eine geeignete Emissionsverbindung im grünen Bereich, obgleich bei bestimmten Immunoassays und Zellanalysensystemen die Hintergrund-Autofluoreszenz, welche durch Anregung bei Fluorescein-Absorptionswellenlängen erzeugt wird, die Empfindlichkeit der Erfassung beschränkt. Jedoch hat sich das herkömmliche rotfluoreszierende Markierungsmittel Rhodamin als weniger wirksam als Fluorescein erwiesen. Texasrot® ist ein geeignetes Markierungsmittel, das bei 578 nm angeregt werden kann und maximal bei 610 nm fluoresziert.

Phycobiliproteine haben einen wichtigen Beitrag wegen ihres hohen Extinktionskoeffizienten und der hohen Quantenausbeute gemacht. Diese Chromophor enthaltenden Proteine können kovalent an viele Proteine gebunden werden, und sie werden in Fluoreszenz-Antikörper-Assays in der Mikroskopie und der Fließ-Cytometrie verwendet. Die Phycobiliproteine haben jedoch folgende Nachteile: (1) die Protein-Markierungsverfahrensweise ist relativ komplex; (2) die Protein-Markierungsleistung ist gewöhnlich nicht hoch (typischerweise ein Mittel von 0,5 Phycobiliprotein-Moleküle pro Protein); (3) das Phycobiliprotein ist ein Naturprodukt, und seine Herstellung und Reinigung ist komplex; (4) die Phycobiliproteine sind teuer; (5) es sind keine Phycobiliproteine als Markierungs-Reagenzien verfügbar, die weiter zum roten Bereich des Spektrums als Allophycocyanin fluoreszieren, welches maximal bei 680 nm fluoresziert; (6) die Phycobiliproteine sind chemisch relativ instabil; (7) sie sind leicht einer Photobleichung unterworfen; (8) die Phycobiliproteine sind große Proteine mit Molekulargewichten im Bereich von 33 000 bis 240 000, und sie sind größer als viele Materialien, die markiert werden sollen, wie Metabolite, Arzneimittel, Hormone, derivatisierte Nucleotide und viele Proteine mit Einschluß von Antikörpern. Der letztergenannte Nachteil ist von besonderer Wichtigkeit, da Antikörper, Avidin, DNA-Hybridisierungssonden, Hormone und kleine Moleküle, die mit den großen Phycobiliproteinen markiert sind, nicht dazu imstande sein können, sich an ihre Targets wegen sterischer Begrenzungen zu binden, die durch die Größe des konjugierten Komplexes auferlegt werden. Die Bindungsrate von Konjugaten an Targets ist gegenüber niedermolekularen Konjugaten langsam.

Durch andere Techniken, wie Histologie, Cytologie, Immunoassays, würden auch erhebliche Vorteile durch die Verwendung eines Fluoreszenzmittels mit hoher Quanteneffizienz, Absorptions- und Emissionseigenschaften bei längeren Wellenlängen und mit einfacher Durchführung der Konjugierung, die von einer nichtspezifischen Interferenz im wesentlichen frei sind, erfahren.

Gemäß der Erfindung werden reaktive fluoreszierende arylsulfonierte Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe mit relativ großen Extinktionskoeffizienten und hohen Quantenausbeuten zum Zwecke der Erfassung und quantitativen Bestimmung von markierten Komponenten verwendet.

Fluoreszierende Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe können zur Markierung von biologischen Materialien, wie Antikörpern, Antigenen, Avidin, Streptavidin, Proteinen, Peptiden, derivatisierten Nucleotiden, Kohlenhydraten, Lipiden, biologischen Zellen, Bakterien, Viren, Blutzellen, Gewebezellen, Hormonen, Lymphokinen, biologischen Spurenmolekülen, Toxinen und Arzneimitteln, verwendet werden. Fluoreszenz-Farbstoffe können auch zur Markierung von nichtbiologischen Materialien, wie löslichen Polymeren und Polymeren und Glasteilchen, Arzneimitteln, Leitern, Halbleitern, Glas- und Polymeroberflächen, Polymermembranen und anderen festen Teilchen, verwendet werden. Die zu markierende Komponente kann auch in einem Gemisch mit anderen Materialien vorliegen. Das Gemisch, in dem die Markierungsreaktion stattfindet, kann ein flüssiges Gemisch, insbesondere ein wässriges Gemisch, sein. Die Erfassungsstufe kann mit dem Gemisch in flüssigem oder trock-

nem Zustand, beispielsweise einem Objektträger, durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß ist es erforderlich, daß Cyanin-Farbstoffe durch die Einarbeitung einer reaktiven Gruppe in das Cyaninmolekül modifiziert werden. Diese reaktive Gruppe heftet sich kovalent an ein Ziel- bzw. Targetmolekül, vorzugsweise an eine Amin- oder Hydroxystelle, und in manchen Fällen an eine Sulfhydryl- oder Aldehydstelle. Die Erfindung verwendet auch die Modifizierung oder Verwendung von Cyanin- und damit verwandten Farbstoffstrukturen, um ihre Löslichkeit in der Testflüssigkeit zu erhöhen, um (1) ihre Handhabung bei Markierungsreaktionen leichter zu machen, (2) die Aggregation des Farbstoffs auf der Oberfläche der zu markierenden Proteine zu verhindern helfen und (3) die nichtspezifische Bindung von markierten Materialien an biologische Materialien und an Oberflächen und die Assayvorrichtung zu verhindern helfen.

Die Cyanin- und die damit verwandten Farbstoffe bieten einen wichtigen Vorteil über derzeit verfügbare fluoreszierende Markierungs-Reagentien. Zum ersten sind Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe synthetisiert worden, die in einem Bereich des Spektrums von 400 bis nahezu 1100 nm absorbieren und emittieren. Somit können reaktive Derivate dieser Farbstoffe für Assays hergestellt werden, die eine gleichzeitige Messung einer Anzahl von markierten Materialien erfordern. Die Vielfarben-(oder Multiparameter-)analyse dieser Art kann im Interesse der Einfachheit, der Kostenwirksamkeit oder zur Bestimmung von Verhältnissen von verschiedenen markierten Arten auf jedem Teilchen in einem komplexen Gemisch von Teilchen zweckmäßig sein (zum Beispiel der Verhältnisse von Antigen-Markern auf individuellen Blutzellen in einem komplexen Gemisch durch Multiparameter-Fließ-Cytometrie oder Fluoreszenz-Mikroskopie). Zum zweiten absorbieren und fluoreszieren viele Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe stark. Zum dritten sind viele Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe relativ photostabil, und sie bleichen nicht ohne weiteres im Fluoreszenz-Mikroskop. Zum vierten können Cyanin- und damit verwandte Derivate hergestellt werden, die einfache und wirksame Kupplungs-Reagentien sind. Zum fünften sind viele Strukturen und synthetische Verfahrensweisen verfügbar, und die Klasse der Farbstoffe ist vielfältig. Es können daher viele Strukturmodifikationen durchgeführt werden, um die Reagentien mehr oder weniger wasserlöslich zu machen. Ihre Ladung kann verändert werden, so daß sie das Molekül nicht stören, an das sie angefügt sind, wodurch die nichtspezifische Bindung reduziert werden kann. Zum sechsten sind im Gegensatz zu den Phycobiliproteinen die Cyanin-Farbstoffe relativ klein (Molekulargewicht = 1000), so daß sie nicht nennenswerterweise mit der Fähigkeit des markierten Moleküls sterisch interferieren, ihre Bindungsstelle rasch zu erreichen oder ihre Funktion auszuüben.

Somit bringen Cyanin-Farbstoff-Markierungsmittel viele potentielle Vorteile mit sich. Diese Farbstoffe können dazu verwendet werden, um ein oder mehrere Komponenten in einer Flüssigkeit, insbesondere einer wäßrigen Flüssigkeit, selektiv zu markieren. Die markierten Komponenten können sodann durch optische oder Lumineszenzmethoden erfaßt werden. Alternativ kann die markierte Komponente dazu verwendet werden, um eine zweite Komponente anzufärben, für die sie eine starke Affinität besitzt. Die Anwesenheit der zweiten Komponente wird sodann durch optische oder Lumineszenzmethoden festgestellt. In diesem Fall wird der Farbstoff mit einer Amin-, Hydroxy-, Aldehyd- oder Sulfhydrylgruppe auf der markierten Komponente umgesetzt. So kann beispielsweise die markierte Komponente ein Antikörper sein, und die angefärbte Komponente, für die sie eine starke Affinität hat, kann eine biologische Zelle, ein Antigen oder ein Hapten oder eine biologische Zelle oder ein Teilchen, das das genannte Antigen oder Hapten enthält, sein. Gemäß einem weiteren Beispiel ist die markierte Komponente Avidin, und die angefärbte Komponente kann ein biotinyliertes Material sein. Auch können Lectine, die mit Polymethin-Cyanin-Farbstoffen konjugiert sind, dazu verwendet werden, um spezielle Kohlenhydratgruppen zu erfassen und quantitativ zu bestimmen. Weiterhin können Lumineszenz-Cyanin- und damit verwandte Farbstoffe an Fragmente von DNA oder RNA angeheftet werden. Die markierten Fragmente von DNA oder RNA können als Fluoreszenz-Hybridisierungssonden verwendet werden, um das Vorhandensein und die Menge von spezifischen komplementären Nucleotid-Sequenzen in Proben, die DNA oder RNA enthalten, zu identifizieren. Auch kann der Farbstoff an ein Hormon oder an einen Liganden (zum Beispiel ein Hormon, ein Protein, ein Peptid, ein Lymphokin, einen Metaboliten) angefügt werden, das bzw. der danach an einen Rezeptor angefügt wird.

Für andere Zwecke in Patentschriften beschriebene reaktive Cyanin-Farbstoffe

Gemäß den US-PS 43 37 063 (Miraha et al.), 44 04 289, 44 05 711 und 44 14 325 (Masuda et al.) ist eine Vielzahl von Cyanin-Farbstoffen synthetisiert worden, die aktive N-Hydroxysuccinimidester-Gruppen enthalten. Diese Patente zeigen, daß diese Reagentien als photographische Sensibilisatoren verwendet werden können. Die möglichen Fluoreszenz-Eigenschaften dieser Reagentien sind in den Patenten nicht genannt. Tatsächlich sind auch für diese Prozesse keine Fluoreszenz-Eigenschaften erforderlich. Die meisten der in diesen Patentschriften genannten Farbstoffe sind nur schwach fluoreszierend, und sie sind nicht besonders photostabil. Weiterhin sind ihre Löslichkeitseigenschaften für viele Anwendungszwecke nicht optimal, die eine Fluoreszenzerfassung von markierten Materialien beinhalten würden.

In der GB-PS 15 29 202 (Ezekiel et al.) werden zahlreiche Cyanin-Farbstoffderivate beschrieben, die als kovalent reagierende Moleküle verwendet werden. Die in diesen Reagentien verwendete reaktive Gruppe ist eine Azingruppe, zu der Mono- und Dichlortriazingruppen gehören. Diese Druckschrift bezieht sich auf die Entwicklung und die Verwendung dieser Reagentien als Sensibilisatoren für photographische Filme. Für dieses Verfahren ist keine Fluoreszenz erforderlich, und die meisten der darin beschriebenen Reagentien sind nicht fluoreszierend. Schließlich bezieht sich diese Druckschrift nicht auf die Entwicklung und Verwendung von reaktiven Cyanin-Farbstoffen zum Zwecke der Erfassung und quantitativen Bestimmung von markierten Materialien.

Die vorliegende Erfindung betrifft Methoden zum kovalenten Anheften von lumineszierenden Cyanin- und cyaninartigen Farbstoffen an biologische Materialien, nichtbiologische Materialien und Makromoleküle und

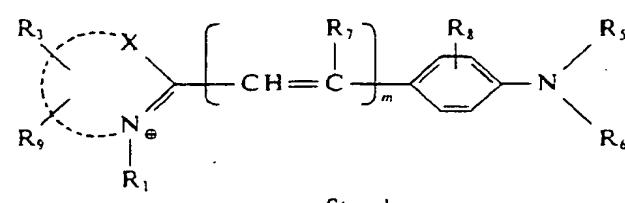
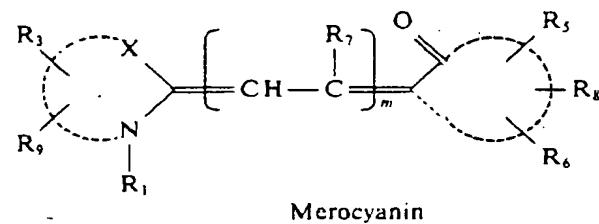
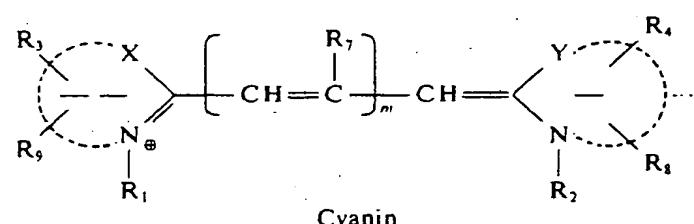
Teilchen, damit diese Materialien lumineszierend markiert werden. Auf diese Weise kann das markierte Material durch Lumineszenz-Erfassungsmethoden erfaßt und/oder quantitativ bestimmt werden.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erfassung einer Komponente in einer Flüssigkeit, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man zu der genannten Flüssigkeit einen Farbstoff zusetzt, der aus der Gruppe bestehend aus Cyanin-, Merocyanin- und Styryl-Farbstoffen ausgewählt ist und der in der Flüssigkeit löslich ist und einen Substituenten enthält, damit er mit Amin- und Hydroxygruppen und möglicherweise mit Aldehyd- und Sulfhydrylgruppen auf der genannten Komponente kovalent reaktiv wird, so daß die genannte Komponente markiert wird. Die markierte Komponente wird sodann durch Lumineszenz- oder Lichtabsorptionsmethoden erfaßt und/oder quantitativ bestimmt. Wenn die markierte Komponente ein Antikörper, ein DNA-Fragment, ein Hormon, ein Lymphokin oder ein Arzneimittel ist, dann kann die markierte Komponente dazu verwendet werden, um das Vorhandensein einer zweiten Komponente, an die es gebunden wird, zu identifizieren, worauf die zweite Komponente erfaßt und/oder quantitativ bestimmt werden kann.

Jede beliebige Lumineszenz- oder Lichtabsorptions-Erfassungsstufe kann angewendet werden. So kann beispielsweise die Erfassungsstufe eine optische Erfassungsstufe sein, bei der die Flüssigkeit mit Licht von ersten definierten Wellenlängen bestrahlt wird. Licht mit zweiten definierten Wellenlängen, das durch die markierte Komponente fluoresziert oder phosphoresziert wird, wird hierauf erfaßt. Die Erfassung kann auch durch optische Lichtabsorption erfolgen. So kann beispielsweise die Erfassungsstufe in der Weise durchgeführt werden, daß man Licht mit ersten definierten Wellenlängen durch die Flüssigkeit leitet und sodann die Wellenlänge des Lichts, das durch die Flüssigkeit hindurchgelassen wird, bestimmt.

Gewünschtenfalls kann die Erfassungsstufe auch eine chemische Analyse umfassen, um chemisch eine Anheftung des Cyanins oder eines verwandten Chromophors an die Komponente zu erfassen.

Die Grundstrukturen der Cyanin-, Merocyanin- und Styryl-Farbstoffe, die modifiziert werden können, um kovalente Markierungs-Reagentien zu erzeugen, sind nachfolgend gezeigt:



50

55

Spezifischere Beispiele von Polymethin-Cyanin-Farbstoffen sind wie folgt:

5

10

15

20

25

30

35

40

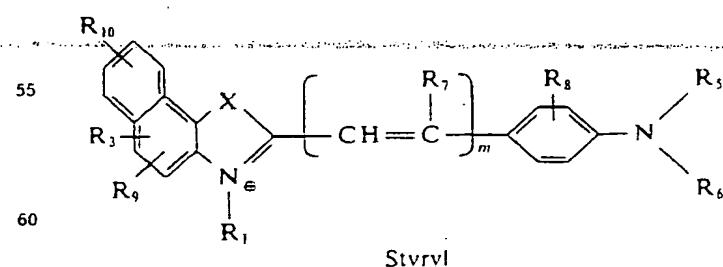
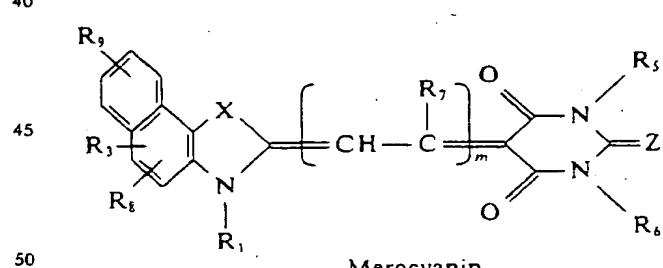
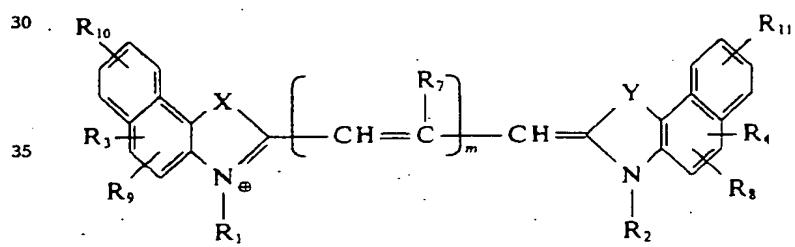
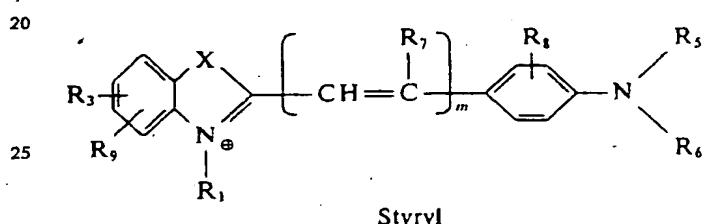
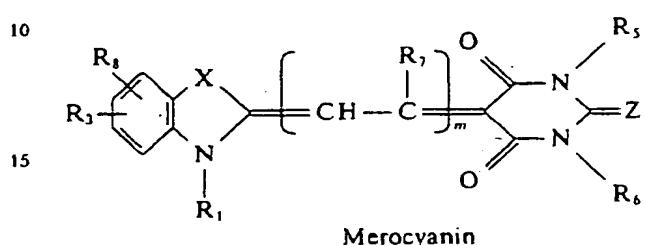
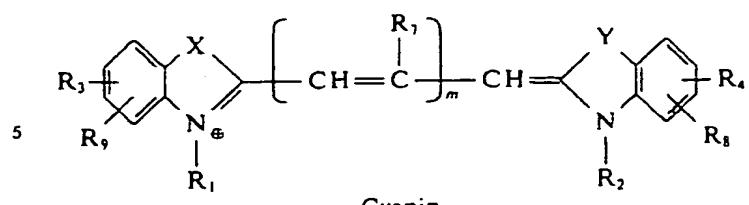
45

50

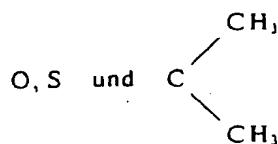
55

60

65



65 In diesen Strukturen sind
X und Y aus der Gruppe



5

ausgewählt;

Z ist aus der Gruppe O und S ausgewählt und

m ist eine ganze Zahl, die aus der Gruppe bestehend aus 1, 2, 3 und 4 ausgewählt ist.

In den obigen Formeln bestimmt die Anzahl der Methingruppen zum Teil die Anregungsfarbe. Die cyclischen Azinstrukturen können auch zum Teil die Anregungsfarbe bestimmen. Oftmals tragen höhere Werte von m zu einer gesteigerten Lumineszenz und Absorption bei. Bei Werten von m oberhalb 4 wird die Verbindung instabil. Eine weitere Lumineszenz kann durch Modifikationen der Ringstrukturen verliehen werden. Wenn $m = 2$, dann ist die Anregungswellenlänge etwa 650 nm, und die Verbindung ist sehr stark fluoreszierend. Maximale Emissionswellenlängen sind im allgemeinen 15 bis 100 nm höher als die maximalen Anregungswellenlängen.

Mindestens einer, vorzugsweise nur einer, und möglicherweise zwei oder mehr der genannten Gruppen $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ und R_7 in jedem Molekül ist bzw. sind eine reaktive Gruppe zur Anheftung des Farbstoffs an die markierte Komponente. Für bestimmte Reagentien kann mindestens eine der Gruppen $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ und R_7 auf jedem Molekül auch eine Gruppe sein, die die Löslichkeit des Chromophors erhöht oder die Selektivität der Markierung der markierten Komponente beeinträchtigt oder die Position der Markierung der markierten Komponente durch den Farbstoff beeinträchtigt.

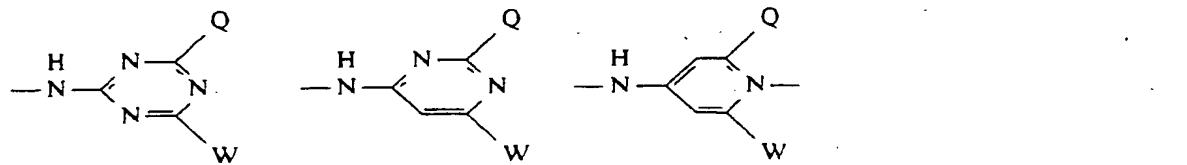
In den genannten Formeln umfaßt mindestens eine der genannten Gruppen R_8, R_9 (wenn vorhanden) und R_{10} (wenn vorhanden) mindestens eine Sulfonatgruppe. Die Bezeichnung Sulfonat soll Sulfonsäure einschließen, da die Sulfonatgruppe nur eine ionisierte Sulfonsäure darstellt.

Reaktive Gruppen, die direkt oder indirekt an den Chromophor angefügt werden können, um die Gruppen $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ und R_7 zu bilden, können reaktive Gruppierungen einschließen, beispielsweise Gruppen, die Isothiocyanat, Isocyanat, Monochlortriazin, Dichlortriazin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes Pyridin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes Diazin, Maleimid, Aziridin, Sulfonylhalogenid, Säurehalogenid, Hydroxysuccinimidester, Hydroxysulfosuccinimidester, Imidoester, Hydrazin, Azidonitrophenyl, Azid, 3-(2-Pyridylthio)-propionamid, Glyoxal und Aldehyd enthalten.

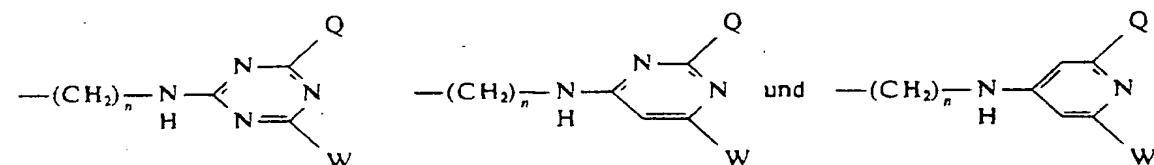
Spezielle Beispiele für die Gruppen $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ und R_7 , die besonders gut für Markierungskomponenten mit verfügbaren Amino-, Hydroxy- und Sulfhydrylgruppen geeignet sind, sind die folgenden Gruppen:



35



40



45

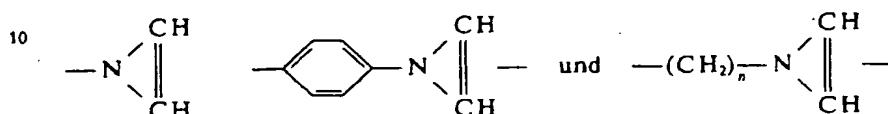
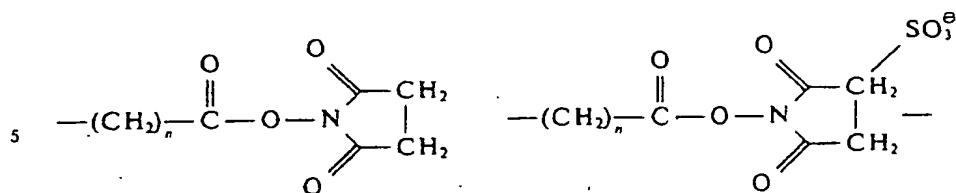
50

wobei mindestens eines von Q oder W eine Austrittsgruppe, wie I, Br, Cl, ist:

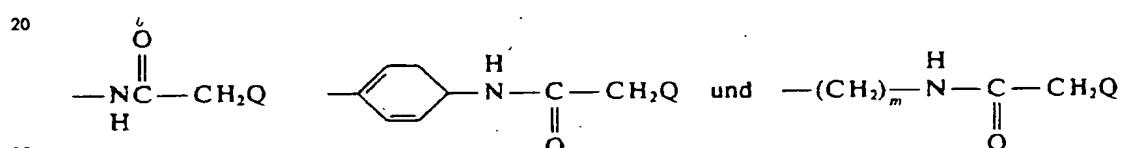
55

60

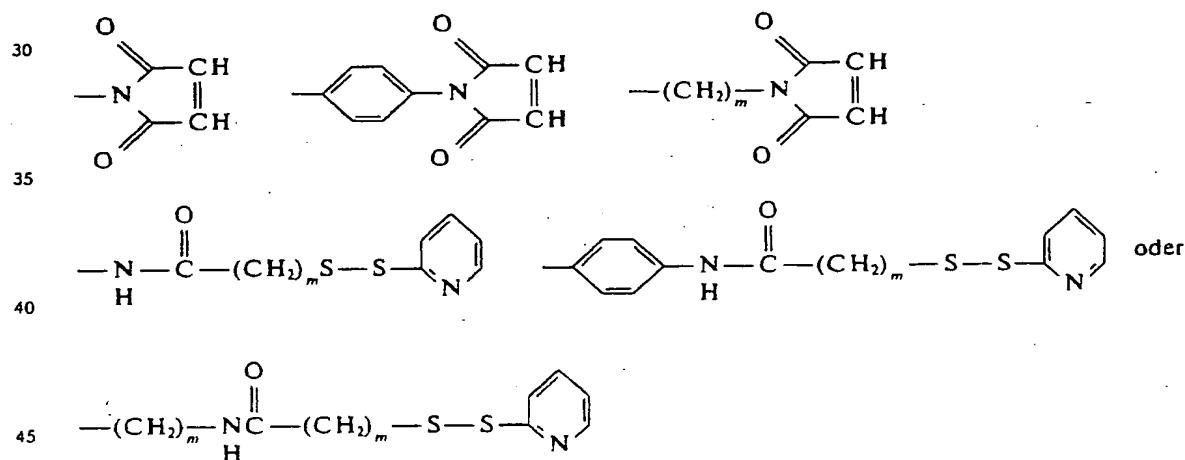
65



15 Spezielle Beispiele von Gruppen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 , die besonders gut zum Markieren von Komponenten mit verfügbaren Sulfhydrylgruppen geeignet sind und die in einem Zweistufen-Verfahren zur Markierung von Antikörpern verwendet werden können, sind die folgenden Gruppen:

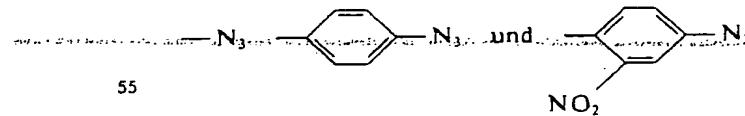


worin Q eine Austrittsgruppe, wie I oder Br, ist:



worin n 0 oder eine ganze Zahl ist.

50 Spezielle Beispiele für die Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇, die besonders gut zum Markieren von Komponenten durch lichtaktiviertes Vernetzungsverknüpfen geeignet sind, sind die folgenden Gruppen:



Zum Zwecke der Erhöhung der Wasserlöslichkeit oder der Verminderung einer unerwünschten nichtspezifischen Bindung der markierten Komponente an ungeeignete Komponenten in der Probe oder zur Verminderung von Reaktionen zwischen zwei oder mehreren reaktiven Chromophoren auf der markierten Komponente, was zum Auslöschen der Fluoreszenz führen könnte, können die Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ aus den gut bekannten polaren und elektrisch geladenen chemischen Gruppen ausgewählt werden. Beispiele hierfür sind –E–F, wobei F Hydroxy, Sulfonat, Sulfat, Carboxylat, substituiertes Amino oder quaternäres Amino ist und wobei E eine Abstandsgruppe, wie $-(CH_2)_n-$ ist, wobei n 0, 1, 2, 3 oder 4 ist. Geeignete Beispiele sind zum Beispiel Alkylsulfonat, $-(CH_2)_3SO^{3-}$ und $(CH_2)_4- SO_3^{2-}$.

Die Polymethinkette der Lumineszenz-Farbstoffe gemäß der Erfindung kann auch eine oder mehrere cyclische chemische Gruppen enthalten, die Brücken zwischen zwei oder mehreren der Kohlenstoffatome der Polymethinkette bilden. Diese Brücken könnten dazu dienen, die chemische oder die Photostabilität des Farb-

stoff zu erhöhen, und sie könnten dazu verwendet werden, die Absorptions- und Emissionswellenlängen des Farbstoffes zu verändern oder seinen Extinktionskoeffizienten oder seine Quantenausbeute zu verändern. Verbesserte Löslichkeitseigenschaften könnten durch diese Modifizierung erhalten werden.

Erfindungsgemäß kann die markierte Komponente aus folgenden Substanzen ausgewählt werden: Antikörpern, Proteinen, Peptiden, Enzymsubstraten, Hormonen, Lymphokinen, Metaboliten, Rezeptoren, Antigenen, Haptenen, Lectinen, Avidin, Streptavidin, Toxinen, Kohlenhydraten, Oligosacchariden, Polysacchariden, Nucleinsäuren, Deoxynucleinsäuren, derivatisierten Nucleinsäuren, derivatisierten Deoxynucleinsäuren, DNA-Fragmenten, RNA-Fragmenten, derivatisierten DNA-Fragmenten, derivatisierten RNA-Fragmenten, natürlichen Arzneimitteln, Virusteilchen, Bakterienteilchen, Viruskomponenten, Hefekomponenten, Blutzellen, Blutzellkomponenten, biologischen Zellen, nichtzellulären Blutkomponenten, Bakterien, bakteriellen Komponenten, natürlichen und synthetischen Lipidbläschen, synthetischen Arzneimitteln, Giften, umweltverschmutzenden Stoffen, Polymeren, Polymerteilchen, Glasteilchen, Glasoberflächen, Kunststoffteilchen, Kunststoffoberflächen, Polymermembranen, Leitern und Halbleitern.

Ein Cyanin oder ein damit verwandter Chromophor kann auch hergestellt werden, der, wenn er mit einer Komponente umgesetzt wird, Licht bei 633 nm absorbieren kann. In der Erfassungsstufe kann ein Helium-Neon-Laser verwendet werden, der Licht bei dieser Wellenlänge des Spektrums emittiert. Auch kann ein Cyanin- oder damit verwandter Farbstoff hergestellt werden, der, wenn er mit einer Komponente umgesetzt wird, Licht maximal zwischen 700 nm und 900 nm absorbieren kann. In diesem Fall kann in der Erfassungsstufe eine Laserdiode verwendet werden, die Licht in diesem Bereich des Spektrums emittiert.

Selektivität

Die oben angegebenen reaktiven Gruppen sind relativ spezifisch für die Markierung bestimmter funktioneller Gruppen auf Proteinen und anderen biologischen oder nichtbiologischen Molekülen, Makromolekülen, Oberflächen oder Teilchen, vorausgesetzt, daß geeignete Reaktionsbedingungen mit Einschluß von geeigneten pH-Bedingungen angewendet werden.

Eigenschaften der reaktiven Cyanin-, Merocyanin- und Styryl-Farbstoffe und ihrer Produkte

Die Spektraleigenschaften der erfundungsgemäßen Farbstoffe werden durch die hierin beschriebene Funktionalisierung nicht nennenswert verändert. Die Spektraleigenschaften der markierten Proteine und der anderen Verbindungen sind gleichfalls nicht sehr verschieden von denjenigen des Grund-Farbstoffmoleküls, das nicht an ein Protein oder ein anderes Material konjugiert worden ist. Die hierin beschriebenen Farbstoffe haben, allein oder an ein markiertes Material konjugiert, im allgemeinen große Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 100\,000$ bis 250 000), hohe Quantenausbeuten so hoch wie 0,4 in bestimmten Fällen, und sie absorbieren und emittieren Licht im Spektralbereich von 400 bis 900 nm. Somit sind sie von besonderem Wert als Markierungs-Reagentien für die Lumineszenz-Erfassung.

Optische Erfassungsmethoden

Zur Erfassung bzw. Bestimmung einer markierten oder gefärbten Komponente kann jede beliebige Methode angewendet werden. Die Erfassungsmethode kann eine Lichtquelle verwenden, die das Gemisch, welches das markierte Material enthält, mit Licht mit ersten definierten Wellenlängen bestrahlt. Bekannte Vorrichtungen werden verwendet, die Licht mit zweiten Wellenlängen erfassen, welches Licht durch das Gemisch hindurchgelassen worden ist oder das durch das Gemisch fluoresziert oder luminesziert wird. Solche Erfassungsvorrichtungen sind beispielsweise Fluoreszenz-Spektrometer, Absorptions-Spektrophotometer, Fluoreszenz-Mikroskope, Lichtdurchlässigkeits-Mikroskope und Fließ-Cytometer, optische Fasersensoren und Immunoassay-Instrumente.

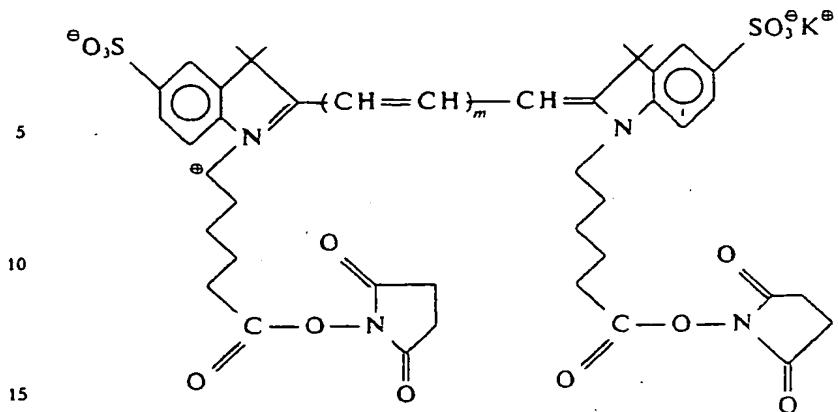
Bei dem erfundungsgemäßen Verfahren können auch chemische Analysenmethoden verwendet werden, um die Anheftung des Farbstoffs an die markierte Komponente oder die markierten Komponenten zu erfassen. Beispiele für chemische Analysenmethoden sind die Infrarot-Spektrometrie, die NMR-Spektrometrie, die Absorptions-Spektrometrie, die Fluoreszenz-Spektrometrie, die Massen-Spektrometrie und die Chromatographie.

Die Erfindung wird in den Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Effekt des pH-Werts auf die Konjugierung von Sulfoindodicarbocyanin mit Protein

Proben von Schaf- γ -Globulin (4 mg/ml) in 0,1 M Carbonat-Puffern (pH = 8,5, 8,9 und 9,4) wurden bei Raumtemperatur mit einem 10fachen molaren Überschuß des folgenden aktiven Sulfoindodicarbo-cyaninesters ($m = 2$) vermischt.



Zu geeigneten Zeitpunkten, die sich von 5 Sekunden bis 30 Minuten erstreckten, wurden Proteinproben von nichtkovalent angeheftetem Farbstoff durch Gel-Permeationschromatographie auf Sephadex® G-50 abgetrennt. Die maximale Markierung des Proteins erfolgte nach 10 Minuten und ergab End-Molverhältnisse von Farbstoff/Protein von 5,8, 6,4 und 8,2 für die Proben, die bei pH-Werten von 8,5, 8,9 bzw. 9,4 inkubiert worden waren. Die Zeiten, die erforderlich waren, um ein Farbstoff/Protein-Verhältnis von 5 und Quantenausbeuten der Produkte bei den verschiedenen pH-Werten zu ergeben, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	pH-Wert	Zeit (s)	QA
	8,5	115	0,09
30	8,9	53	0,09
	9,4	6,5	0,17

Diese Werte zeigen, daß die Protein-Markierung mit diesem Farbstoff bei einem pH-Wert von 9,4 besser ist als bei einem pH-Wert von unterhalb 9. In dem Puffer mit höherem pH-Wert war die Konjugierungsreaktion sehr rasch, doch war die Markierungswirksamkeit ausgezeichnet, und das Produkt war stärker fluoreszierend. Der Wert der Quantenausbeute gibt die mittlere Quantenausbeute pro Farbstoffmolekül auf dem markierten Protein wieder.

Beispiel 2

Konjugation des aktiven Sulfoindocarbocyaninesters mit Protein

Schaf- γ -Globulin (1 mg/ml), gelöst in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4, wurde mit 0,1 m Natriumcarbonat auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt. Ein Cyanin-Farbstoff-Markierungsmit-
45 tel (Struktur in Beispiel 1, $m = 1$) wurde zu aliquoten Teilen dieser Proteinlösung zugegeben, um verschiedene Molverhältnisse von Farbstoff/Protein zu ergeben. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gemische durch Gel-Permeationschromatographie auf Sephadex® G-50 unter Elution mit PBS aufgetrennt. Das Molverhältnis der Farbstoffe, die kovalent an die Proteine in den Produkten angeheftet worden waren, war
50 1,2, 3,5, 5,4, 6,7 und 11,2 für Anfangsverhältnisse von Farbstoff/Protein von 3, 6, 12, 24 bzw. 30.

Beispiel 3

Markierung von AECM-Dextran mit einem Sulfoindodicarbocyanin

N-Aminoethyl-carboxamidomethyl-(AECM-)Dextran mit einem Mittelwert von 16 Aminogruppen pro Dex-
55 tranmolekül wurde aus Dextran mit einem mittleren MW von 70 000 synthetisiert (Inman, J. K., J. Immunol. 114: 704-709 (1975)). Ein Teil des AECM-Dextrans (1 mg/250 μ l), gelöst in 0,1 m Carbonat-Puffer, mit einem pH-
60 Wert von 9,4 wurde zu 0,2 mg des aktiven Sulfoindodicarbocyaninesters (Struktur in Beispiel 1, $m = 2$) gegeben, wobei ein Farbstoff/Protein-Molverhältnis von 10 erhalten wurde. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei Raum-
temperatur gerührt. Das Dextran wurde sodann von nichtkonjugiertem Farbstoff durch Sephadex® G-50-Gel-
Permeationschromatographie unter Verwendung von Ammoniumacetat (50 mM) als Elutions-Puffer abgetrennt. Ein Durchschnitt von 2,2 Farbstoffmolekülen war kovalent an jedes Dextranmolekül gebunden.

Beispiel 4

Markierung eines spezifischen Antikörpers mit aktivem Sulfoindodicarbocyaninester

Gegen Murin IgG spezifisches Schaf- γ -Globulin (1 mg/ml) in 0,1 m Carbonat-Puffer (pH = 9,4) wurde mit dem aktiven Sulfoindodicarbocyaninester (Struktur in Beispiel 1, m = 2) mit einem Verhältnis von 8 Farbstoffmolekülen pro Proteinmolekül vermischt. Nach 30minütigem Inkubieren bei Raumtemperatur wurde das Markierungsgemisch durch Gelfiltration auf Sephadex® G-50, das mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH = 5 7,4) ins Gleichgewicht gebracht worden war, aufgetrennt. Das gewonnene Protein enthielt einen Mittelwert von 4,5 Farbstoffmolekülen, die kovalent an jedes Proteinmolekül angeheftet waren.

Beispiel 5

Anfärbung und mikroskopische Sichtbarmachung von Human-Lymphozyten mit 10 Sulfoindodicarbocyanin-Farbstoff, der an Schaf-Anti-Maus-IgG-Antikörper konjugiert war

Frisch isolierte periphere Blutlymphozyten wurden bei 0°C 30 Minuten lang mit Maus-Anti- β 2-Mikroglobulin (0,25 μ g/10⁶ Zellen) behandelt. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM-Puffer gewaschen und sodann mit dem mit Sulfoindodicarbocyanin markierten Schaf-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1 μ g/10⁶ Zellen) behandelt. Nach 30minütiger Inkubierung bei 0°C wurde überschüssiger Antikörper durch Zentrifugieren der Zellen entfernt, und die Zellen wurden erneut zweimal mit DMEM-Puffer gewaschen. Aliquote Teile der Zellen wurden auf Objektträgern zur Analyse durch Fluoreszenz-Mikroskopie befestigt. Unter dem Mikroskop wurden die Lymphozyten auf dem Objektträger mit Licht mit 610 bis 630 nm bestrahlt, und die Fluoreszenz bei 650 bis 700 nm wurde mit einer rotempfindlichen verstärkten COHU-Fernsehkamera erfaßt, welche an einen Bilddigitalisierer und einen Fernsehmonitor angeschlossen war. Die nach dieser Methode angefärbten Zellen zeigten unter dem Mikroskop eine Fluoreszenz. In einem Kontrollexperiment wurde die Verwendung des primären Maus-Anti- β 2-Mikroglobulin-Antikörpers weggelassen, doch wurde die Färbung und die Analyse sonst wie oben beschrieben durchgeführt. Die Kontrollprobe zeigte unter dem Mikroskop keine Fluoreszenz, was darauf hinweist, daß der mit Sulfoindodicarbocyanin markierte Schaf-Anti-Maus-Antikörper keine signifikante nichtspezifische Bindung an Lymphozyten ergibt. 15 20 25

Patentansprüche

1. Verfahren zum Markieren einer Komponente einer wässrigen Flüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß man 30

(a) zu der die genannte Komponente enthaltenden Flüssigkeit einen Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe Cyanin, Merocyanin und Styryl-Farbstoffe, der an einen aromatischen Kern angeheftet mindestens eine Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe enthält, zusetzt, wobei der genannte Farbstoff mit der genannten Komponente reaktiv ist, und

(b) den Farbstoff mit der genannten Komponente umsetzt, so daß der Farbstoff die genannte Komponente markiert. 35

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff mehr als eine Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff einen Substituenten enthält, um ihn mit einer Amin-, Aldehyd-, Sulfhydryl- oder Hydroxygruppe auf der genannten Komponente kovalent reaktiv zu machen, und daß sich der genannte Farbstoff mit einer oder mehreren der genannten Gruppen umsetzt. 40

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe die Wasserlöslichkeit des Farbstoffs erhöht. 45

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe die Farbstoff/Farbstoff-Wechselwirkungen vermindert, die ein Auslöschen der Fluoreszenz induzieren. 50

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyanin-Farbstoff ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Merocyanin-Farbstoff ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente aus der Gruppe Antikörper, Proteine, Peptide, Enzymsubstrate, Hormone, Lympokine, Metabolite, Rezeptoren, Antigene, Haptene, Lectine, Toxine, Kohlenhydrate, Oligosaccharide, Polysaccharide, Nucleinsäuren, Deoxynucleinsäuren, derivatisierte Nucleinsäuren, derivatisierte Deoxynucleinsäuren, DNA-Fragmente, RNA-Fragmente, derivatisierte DNA-Fragmente, derivatisierte RNA-Fragmente, natürliche Arzneimittel, Virusteilchen, Viruskomponenten, Hefekomponenten, Blutzellen, Blutzellkomponenten, biologische Zellen, nichtzelluläre Blutkomponenten, Bakterien, Bakterienkomponenten, natürliche und synthetische Lipid-Bläschen, synthetische Arzneimittel und natürliche Arzneimittel, Gifte, umweltverschmutzende Stoffe, Polymeren, Polymerteilchen, Glasteilchen, Glasoberflächen, Kunststoffteilchen, Kunststoffoberflächen, Polymermembranen, Leiter und Halbleiter ausgewählt ist. 55

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Stufe der optischen Erfassung der genannten markierten Komponente einschließt. 60

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Erfassungsstufe die Bestrahlung der markierten Komponente mit Licht und die anschließende Erfassung des Lichts, das durch die genannte markierte Komponente fluoresziert wird, umfaßt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Erfassungsstufe die Lichterregung mit einem Laser einschließt. 65

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in der genannten Erfassungsstufe die Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in der genannten Erfassungsstufe die Fließ-Cytometrie verwendet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erfaßte Komponente quantitativ bestimmt wird.

5 15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff ein Styryl-Farbstoff ist.

16. Verfahren zum Markieren einer Komponente in einer wäßrigen Flüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß man

10 (a) zu der die genannte Komponente enthaltenden Flüssigkeit einen Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe Polymethin-Farbstoffe auf Sulfoindolenin-Grundlage und Naphthosulfoindolenin-Grundlage, der mindestens eine Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe angeheftet an einen oder mehrere Ringe eines heterocyclischen Kerns enthält, zusetzt, wobei der genannte Farbstoff gegenüber der genannten Komponente reaktiv ist;

15 (b) den genannten Farbstoff mit der genannten Komponente umsetzt, so daß der genannte Farbstoff die genannte Komponente markiert; und daß man

(c) die genannte markierte Komponente durch optische Methoden erfaßt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff mehr als eine Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe enthält.

18. Verfahren zum Markieren einer ersten Komponente und Verwendung der markierten ersten Komponente zur Bindung mit einer zweiten Komponente, um eine markierte zweite Komponente zu bilden, dadurch gekennzeichnet, daß man

20 (a) zu einer wäßrigen Flüssigkeit, die die genannte erste Komponente enthält, einen Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe Cyanin, Merocyanin und Styryl-Farbstoffe, der mindestens eine an einen aromatischen Kern angefügte Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe enthält, zusetzt, wobei der Farbstoff gegenüber der ersten Komponente reaktiv ist;

25 (b) den genannten Farbstoff mit der genannten ersten Komponente umsetzt, so daß der genannte Farbstoff durch Lumineszenz die genannte erste Komponente markiert, wodurch eine markierte erste Komponente erhalten wird;

(c) die genannte markierte erste Komponente an die genannte zweite Komponente anbindet, um eine markierte zweite Komponente zu bilden; und daß man

30 (d) die genannte markierte zweite Komponente durch eine optische Methode erfaßt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff mehr als eine Sulfonsäure- oder Sulfonatgruppe enthält.

20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Komponente ein Antikörper ist und daß die zweite Komponente eine Substanz aus der Gruppe Antigene, Haptene, biologische Zellen, Viren und Teilchen, die ein Antigen und ein Hapten tragen, ist.

35 21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente ein Lectin ist und daß die genannte zweite Komponente eine Substanz aus der Gruppe Kohlenhydrate, makromolekulare Stoffe, die ein Kohlenhydrat tragen, und Zellen, die ein Kohlenhydrat tragen, ist.

22. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente Avidin oder Streptavidin ist und daß die genannte zweite Komponente ein biotinyliertes Material ist.

40 23. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente ein DNA-Fragment ist und daß die genannte zweite Komponente ein komplementärer Strang von DNA oder RNA ist.

24. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente ein RNA-Fragment ist und daß die genannte zweite Komponente ein komplementärer Strang von DNA oder RNA ist.

45 25. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente ein Ligand aus der Gruppe Hormone, Proteine, Peptide, Lymphokine und Metabolite ist und daß die genannte zweite Komponente ein Rezeptor ist.

26. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente ein Polymerteilchen ist, das eine Substanz aus der Gruppe Antikörper, Nucleinsäure-Fragmente, Arzneimittel, Toxine, Hormone, Metabolite, biologische Zellen, Bakterien, Virusteilchen, Antigene und Haptene enthält und daß die genannte zweite Komponente ein entsprechendes Antigen, eine komplementäre Nucleinsäure-Sequenz, ein Antikörper oder ein Rezeptor ist.

50 27. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte zweite Komponente ein Antikörper ist.

28. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte erste Komponente eine Substanz aus der Gruppe Antigene, Haptene oder Zellen, die ein Antigen oder Hapten enthalten, und Teilchen, die ein Antigen oder Hapten enthalten, ist und daß die genannte zweite Komponente ein Antikörper ist.

60 29. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff sich mit einer Amin-, Hydroxy- oder Sulfhydrylgruppe auf der ersten Komponente umsetzt.

30. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sich der genannte Farbstoff mit einer Aldehydgruppe auf der genannten ersten Komponente umsetzt.

65 31. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff ein Cyanin-Farbstoff ist und sich mit einer Amin- oder Hydroxygruppe auf der genannten ersten Komponente umsetzt.

32. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff ein Cyanin-Farbstoff

ist und sich mit einer Aldehyd- oder Sulfhydrylgruppe auf der genannten ersten Komponente umsetzt.

33. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte zweite Komponente aus der Gruppe Blutzellen, Gewebezellen, Bakterien, Viren, Chromosomen, DNA, RNA, Toxine, Arzneimittel, Hormone und Polymerteilchen ausgewählt ist.

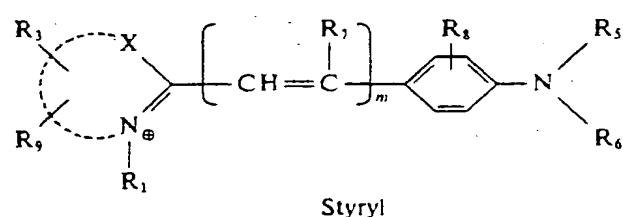
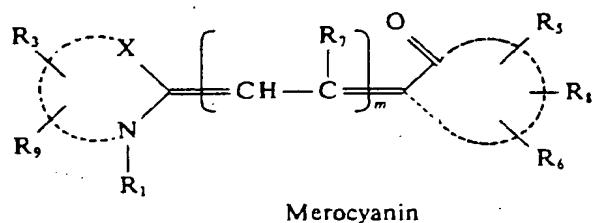
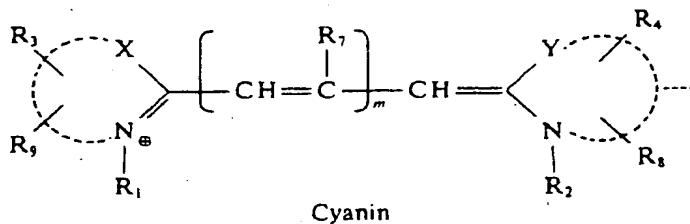
34. Lumineszenzphotostabiles Reaktionsprodukt aus einer Komponente, die eine Amin-, Aldehyd-, Sulfhydryl- oder Hydroxylgruppe enthält und einen in Wasser löslichen Farbstoff aus der Gruppe Polymethin-Farbstoffe auf Sulfoindolenin-Grundlage und Naphthosulfoindolenin-Grundlage, der mindestens einen Substituenten enthält, um ihn gegenüber der genannten Amin-, Aldehyd-, Sulfhydryl- oder Hydroxylgruppe auf der genannten Komponente kovalent reaktiv zu machen, wobei die individuellen Farbstoff-Moleküle auf dem genannten Reaktionsprodukt einen mittleren molaren Extinktionskoeffizienten von mindestens 50 000 l pro mol-cm, eine mittlere Quantenausbeute von mindestens 2% haben und Licht maximal im 400- bis 850-nm-Bereich absorbieren und emittieren, wenn sich die markierte Komponente in einer wäßrigen Umgebung befindet.

35. Reaktionsprodukt nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Komponente ein Antikörper ist.

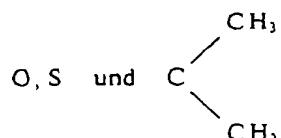
36. Reaktionsprodukt nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Komponente aus der Gruppe Proteine, Peptide, Arzneimittel, Toxine, Metabolite, Lymphokine, Kohlenhydrate, Lipide, Blutzellen, Bakterienteilchen, Virenteilchen, Antigene, Haptene, Polymerteilchen, Glasoberflächen und Polymeroberflächen ausgewählt ist.

37. Reaktionsprodukt nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte zweite Komponente ein DNA- oder RNA-Fragment ist.

38. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Farbstoff aus der Gruppe:



ausgewählt ist, wobei
X und Y aus der Gruppe



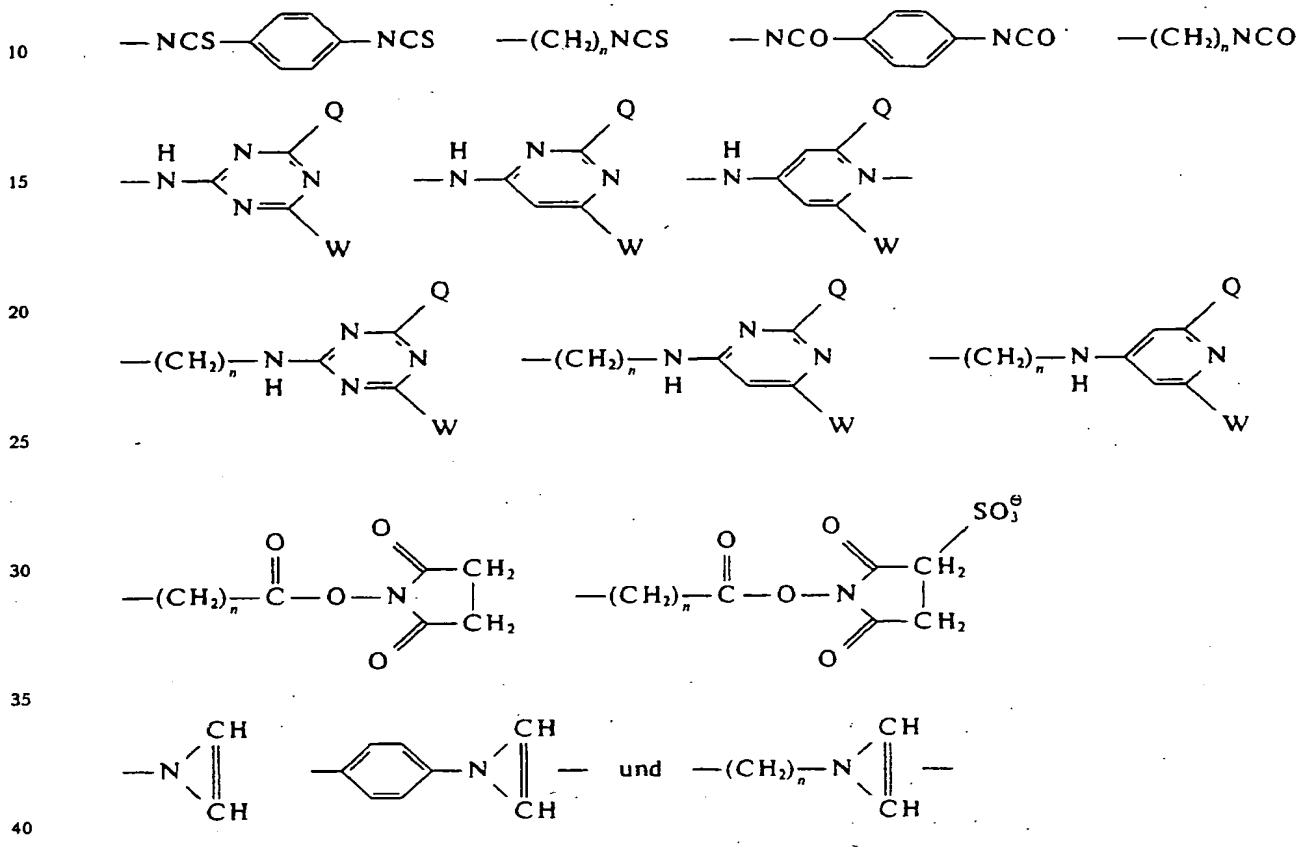
ausgewählt sind;

m eine ganze Zahl aus der Gruppe 1, 2, 3 und 4 ist;

mindestens eine der genannten Gruppen R1, R2, R3, R4, R5, R6 und R7, mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe Isothiocyanat, Isocyanat, Monochlortriazin, Dichlortriazin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes

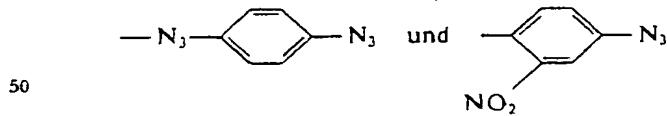
5 Pyridin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes Diacin, Maleimid, Aziridin, Sulfonylhalogenid, Säurehalogenid, Hydroxysuccinimidester, Hydroxysulfosuccinimidester, Imidoester, Hydrazin, Azidonitrophenyl, Azid, 3-(2-Pyridyl-dithio)-propionamid, Glyoxal und Aldehyd enthält; und wobei mindestens eine der genannten Gruppen R₈ und R₉ mindestens eine Arylsulfonyl- oder Arylsulfonat-Gruppierung enthält.

39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe:



enthält, wobei mindestens eines von Q oder W aus der Gruppe Cl, Br und I ausgewählt ist und wobei n den Wert Null hat oder eine beliebige ganze Zahl ist.

40. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der genannten Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe:



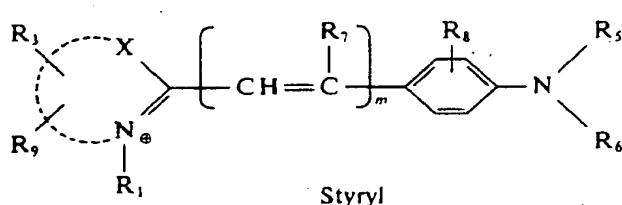
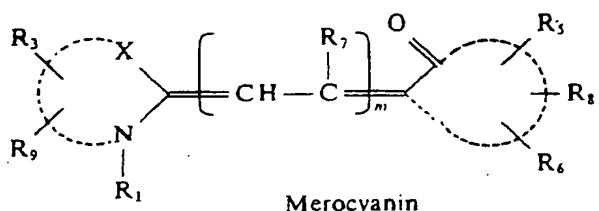
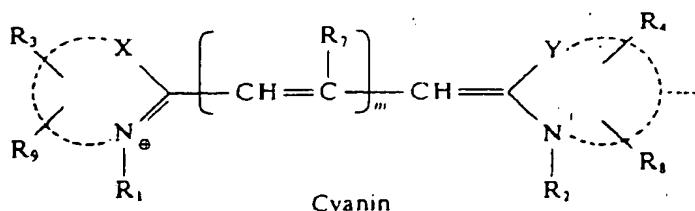
enthält.

41. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der genannten Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ auch mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe Hydroxy, Sulfonat, Sulfat, Carboxylat und substituierte Amin- oder quaternäre Amingruppen enthält.

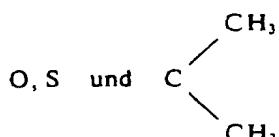
42. Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe:

60

65



30
wobei
X und Y aus der Gruppe



ausgewählt sind;

40
 m eine ganze Zahl aus der Gruppe 1, 2, 3 und 4 ist;

mindestens eine der genannten Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇, mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe Isothiocyanat, Isocyanat, Monochlortriazin, Dichlortriazin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes Pyridin, Mono- oder Dihalogen-substituiertes Diacin, Maleimid, Aziridin, Sulfonylhalogenid, Säurehalogenid, Hydroxysuccinimidester, Hydroxysulfosuccinimidester, Imidoester, Hydrazin, Azidonitrophenyl, Azid, 45
3-(2-Pyridyl-dithio)-propionamid, Glyoxal und Aldehyd enthält; und wobei
mindestens eine der genannten Gruppen R₈ und R₉ mindestens eine Arylsulfonyl- oder Arylsulfonat-Grup-
pierung enthält.

43. Lumineszenz-Farbstoff nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß er wasserlöslich ist.

44. Lumineszenz-Farbstoff nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß er in Wasser einen molaren Extinktionskoeffizienten von mindestens 50 000 l pro mol-cm, eine Quantenausbeute von mindestens 2% hat und daß er im Spektralbereich von 400 bis 900 nm Licht absorbiert und emittiert.

45. Lumineszenz-Farbstoff nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß er in Wasser einen molaren Extinktionskoeffizienten von mindestens 100 000 l pro mol-cm, eine Quantenausbeute von mindestens 10% hat und daß er im Spektralbereich von 600 bis 900 nm Licht absorbiert bzw. emittiert.

46. Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe:

5

10

15

20

25

30

35

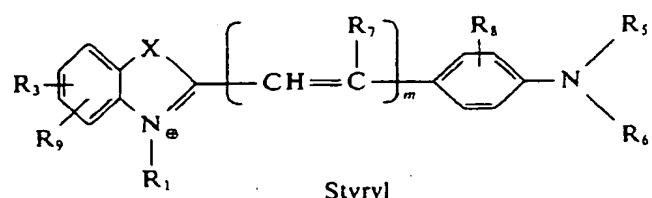
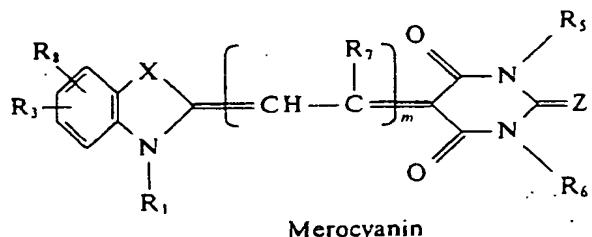
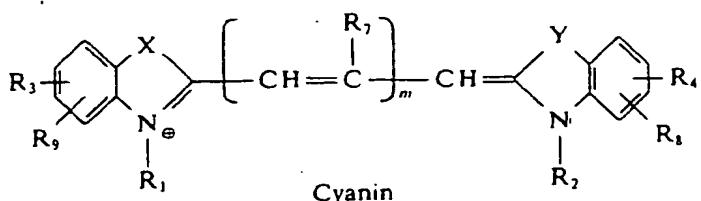
40

50

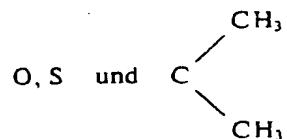
55

60

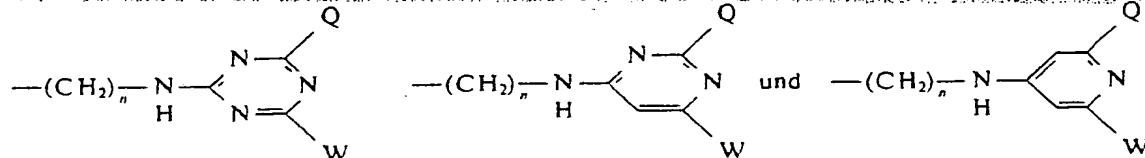
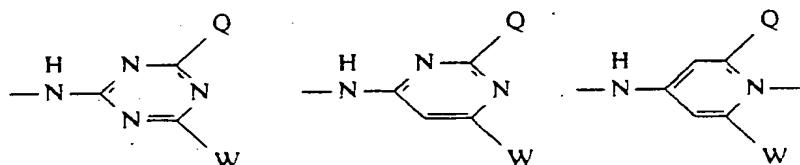
65

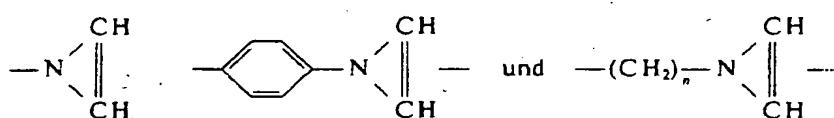
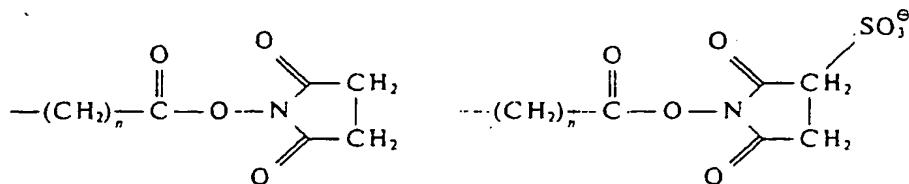


30 worin
X und Y aus der Gruppe



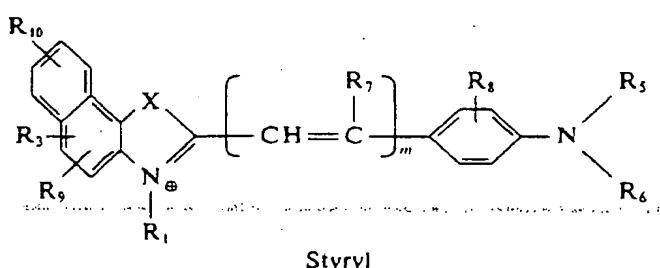
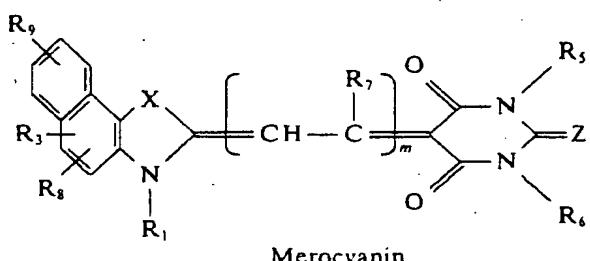
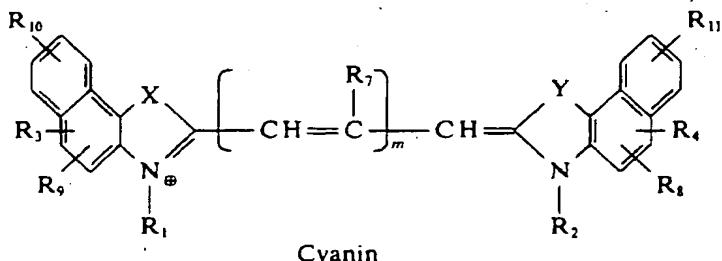
40 ausgewählt sind;
Z aus der Gruppe O und S ausgewählt ist;
m eine ganze Zahl aus der Gruppe 1, 2, 3 und 4 ist und wobei mindestens eine der Gruppen R1, R2, R3, R4, R5, R6 und R7 mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe:



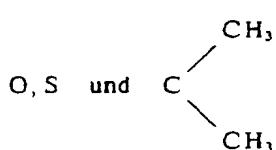


15
enthält, wobei
mindestens eines von Q oder W aus der Gruppe I, Br und Cl ausgewählt ist und n 0 oder eine ganze Zahl ist;
und wobei
mindestens eine der genannten Gruppen R₈ und R₉ (wenn vorhanden) mindestens eine Sulfonat-Gruppierung enthält.

20 47. Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe:

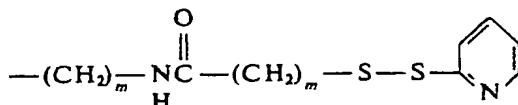
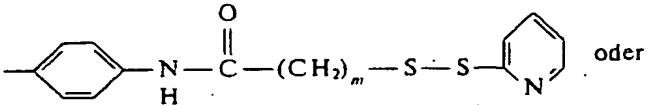
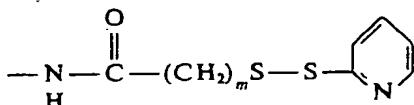
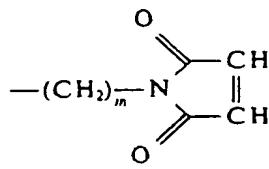
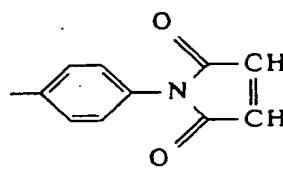
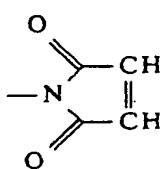


wobei
X und Y aus der Gruppe



65
ausgewählt sind;

Z aus der Gruppe O und S ausgewählt ist;
m eine ganze Zahl aus der Gruppe 1, 2, 3 und 4 ist;
mindestens eine der Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe:

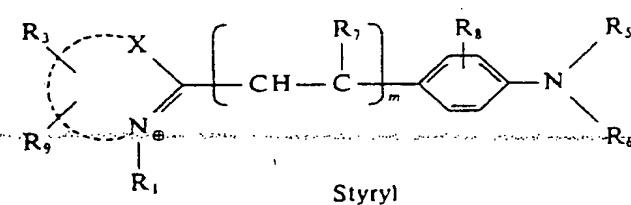
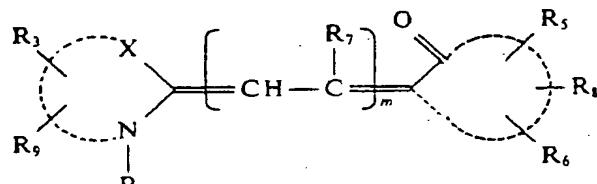
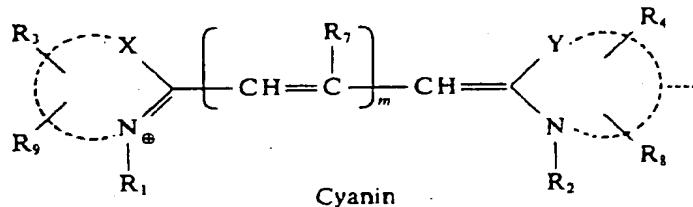


enthält, wobei

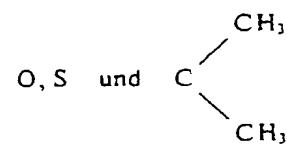
n 0 oder eine ganze Zahl ist; und wobei

mindestens eine der genannten Gruppen R₈, R₉, R₁₀ (wenn vorhanden) und R₁₁ (wenn vorhanden) mindestens eine Sulfonsäure oder Sulfonatgruppierung enthält.

48. Lumineszenz-Farbstoff aus der Gruppe:

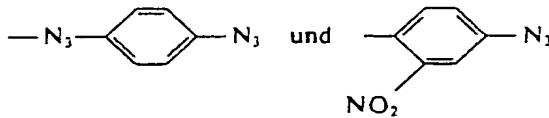


wobei
X und Y aus der Gruppe



ausgewählt sind;

m eine ganze Zahl aus der Gruppe 1, 2, 3 und 4 ist;
mindestens eine der Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇, mindestens eine Gruppierung aus der Gruppe:



5

enthält; und wobei
mindestens eine der Gruppen R₈ und R₉ mindestens eine Arylsulfonsäure- oder Arylsulfonat-Gruppierung enthält.

10

49. Lumineszenz-Farbstoff nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Gruppen R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ und R₇ auch Gruppierungen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit und zur Verminderung der nichtspezifischen Bindung enthält, wobei die Gruppierungen aus Hydroxy-, Sulfonat-, Sulfat-, Carboxylat- und substituierten Amin- oder quaternären Amingruppen ausgewählt sind.

15

50. Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß man ein mit einem Sulfocyanin-Farbstoff markiertes Material mit einem oder mehreren weiteren fluoreszierenden Materialien, die alle Licht signifikant bei einer einzigen Erregungswellenlänge absorbieren, jedoch bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren, vermischt und sodann alle der genannten fluoreszierenden Materialien mit einer einzigen Wellenlänge von Licht anregt und sodann die Menge von jedem der genannten fluoreszierenden Materialien quantitativ bestimmt, indem man ihre individuellen Fluoreszenzsignale bei ihren verschiedenen Fluoreszenz-Wellenlängen erfaßt.

20

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß das mit dem Sulfocyanin-Farbstoff markierte Material ein Antikörper oder eine DNA-Hybridisierungssonde ist.

25

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

— Leerseite —

Fig. 1.

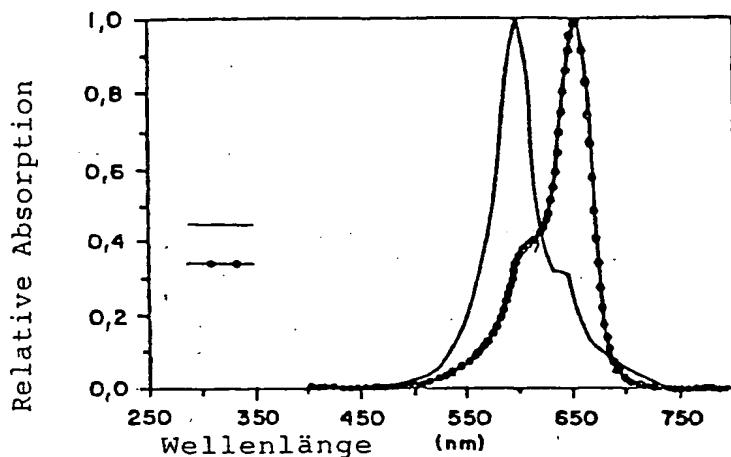


Fig. 2.

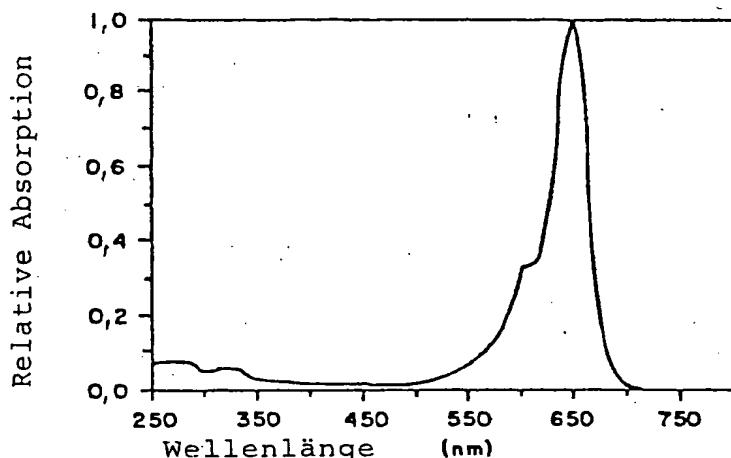


Fig. 3.

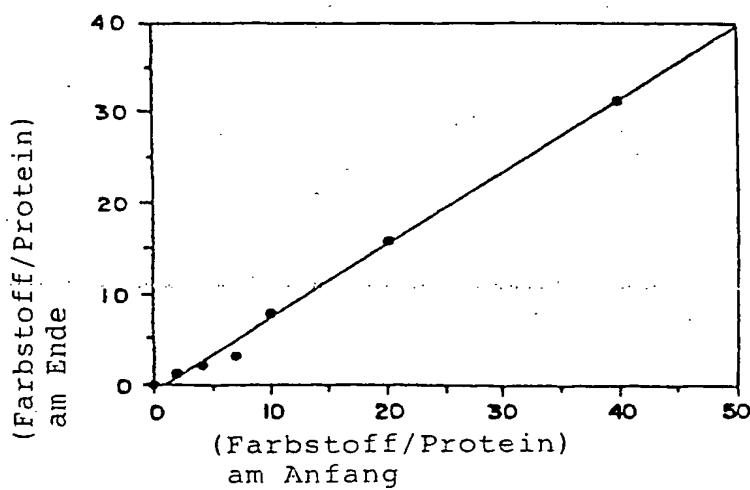


Fig. 4.

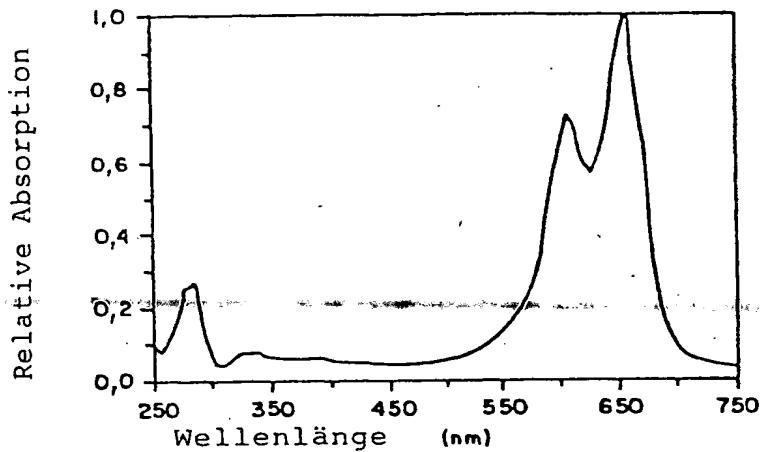


Fig. 5.

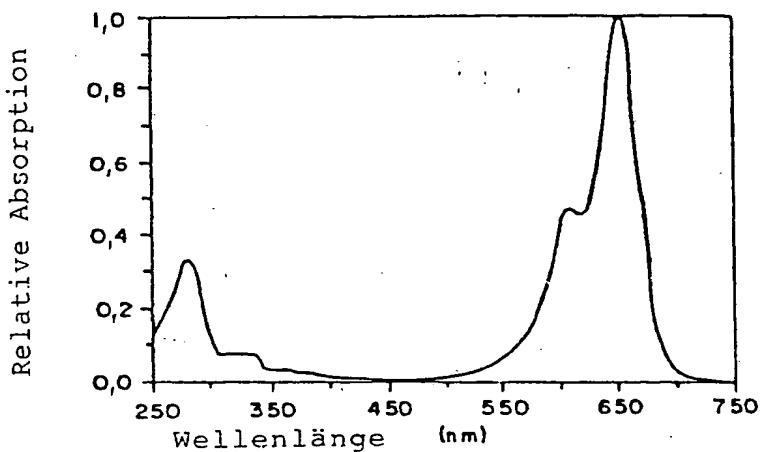


Fig. 6.

